

Institut für Vaskuläre Medizin
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Untersuchungen der 5-Lipoxygenase-Kaskade in Dendritischen Zellen der Maus

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

vorgelegt von
Sandra Döpping
aus
Erfurt
2006

- | | |
|------------------------------------|----------------------------------|
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. R. Wetzker, Jena |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. A.J.R. Habenicht, Jena |
| 3. Gutachter: | Dr. A.M. Kaufmann, Berlin |
| Tag der Doktorprüfung: | 19. Dezember 2005 |
| Tag der öffentlichen Verteidigung: | 27. März 2006 |

Für Josephine

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 Die Zellulären Bestandteile des Immunsystems	3
1.2.1 Die Dendritischen Zellen	4
1.2.2 Untergliederung der Dendritischen Zellen	6
1.2.3 Die Dendritischen Zellen der Haut	9
1.2.4 Die <i>In-vitro</i> Generation von Dendritischen Zellen	11
1.3 Die Humoralen Regulatoren des Immunsystems	11
1.3.1 Das System der Lipxygenasen	13
1.3.1.1 Die 5-Lipxygenase	13
1.3.1.2 Die Leukotriene und ihre Rezeptoren	14
1.4 Die 5-Lipxygenase und Dendritische Zellen	19
1.5 Fragestellung	21
2. Material	22
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial	22
2.2 Chemikalien und Lösungen	23
2.3 Antikörper	24
2.3.1 primäre Antikörper	25
2.3.2 sekundäre Antikörper	25
2.3.3 Isotypkontrollen	25
2.4 Oligonukleotid-Primer	26
2.5 Standards, Enzyme und Reagenziensätze (KITs)	27
2.6 Zytokine, Leukotriene und Medien	27
3. Methoden	28
3.1 Tiere	28
3.1.1 Anästhesie	28
3.2 Isolierung von Zellen aus lymphatischen Geweben	28
3.3 Isolierung der Ohrepidermis	29
3.4 Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen aus Knochenmarkgewebe	30
3.5 Kryopräservierung von Geweben	30
3.6 Anfertigung von Gefrierschnitten	30
3.7 Lokaler Lymphknoten Test	31
3.8 Zellkultur	31
3.9 Kalzium-Messung	32
3.10 Anfertigung von Zytospins	33
3.11 RNA-Gewinnung aus Zellen und Geweben	34
3.12 Qualitätsbestimmung der RNA	34
3.13 DNA-Gewinnung aus Mausschwänzen	35
3.14 Reverse Transkription, PCR und Real-Time PCR	35
3.15 Gelelektrophorese	37
3.15.1 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	37
3.16 Durchflusszytometrie	38
3.17 Indirekte Immunfluoreszenz	39
3.18 Konfokale Laserscanningmikroskopie	40

4. Ergebnisse	42
4.1 Untersuchungen zur Expression der 5-LO in DZ der Maus	42
4.1.1 Identifikation 5-LO exprimierender Zellen der Haut	42
4.1.2 Identifikation 5-LO positiver Zellen der Trachea und der Lunge	46
4.1.3 Untersuchung der 5-LO Expression im Darm	48
4.1.4 Identifikation 5-LO positiver Zellen der Lymphknoten und Milz	49
4.1.5 Nachweis 5-LO exprimierender Zellen im Thymus	57
4.2 Genotypisierung der verwendeten Mausstämme	60
4.3 Langerhans-Zellen der Epidermis	61
4.4 Migration von Langerhans-Zellen	63
4.5 <i>In vitro</i> Generation von DZ aus hämatopoetischen Vorläufern	65
4.5.1 Untersuchung über den Einfluss der Aktivierung von Knochenmark generierten DZ auf die 5-LO Expression und Lokalisation	71
4.5.2 Untersuchung von Knochenmark-generierten DZ durch RT-PCR	74
4.5.3 Kalzium-Messung	76
5. Diskussion	79
5.1 5-LO Expression in verschiedenen Zellpopulationen der Maus	79
5.2 Einfluss der 5-LO auf die Biologie der Langerhans-Zellen	83
5.3 Bedeutung der 5-LO bei der Migration von LZ in die peripheren Lymphknoten	84
5.4 Biologie der <i>in vitro</i> generierten DZ	87
5.5 Lokalisation der 5-LO in LZ und <i>in vitro</i> generierten DZ	89
5.6 Expression funktioneller LT-Rezeptoren in <i>in vitro</i> differenzierten DZ	93
5.7 Einfluss der 5-LO auf die Langerhans-Zellen	95
6. Zusammenfassung	97
7. Literatur	99
8. Anhang	117
8.1 Abbildungsverzeichnis	117
8.2 Tabellenverzeichnis	120
8.3 Abkürzungsverzeichnis	121
8.4 Lebenslauf	123
8.5 Danksagung	124
8.6 Eidesstattliche Erklärung	126

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der alte Wunsch der Menschheit, Mittel und Wege zu finden, um unseren Körper vor möglichst allen Krankheiten zu schützen, blieb bisher unerfüllt. Allerdings stellt die Entdeckung des Immunsystems (lat. immunis = frei, unberührt) einen Meilenstein auf diesem Weg dar, ist doch dieses Abwehrsystem für den Schutz unseres Körpers vor eindringenden Mikroorganismen, Parasiten oder toxischen Substanzen verantwortlich.

Unsere Umwelt ist von einer Vielzahl von Mikroorganismen besiedelt: Viren, Bakterien, Protozoen (einzellige Parasiten) und Pilzen. Viele von ihnen sind für den Körper gefährlich, da ihr Auftreten Krankheiten auslösen kann. Solche Erreger oder auch nur Bestandteile von ihnen werden als pathogen bezeichnet. Die molekularen Bestandteile werden auch als Immunogene oder Antigene bezeichnet und sind in der Regel Proteine oder Lipide, denn nur sie sind in der Lage, eine voll ausgeprägte Immunreaktion zu induzieren.

Um sich vor Pathogenen zu schützen, ist im Laufe der Evolution ein komplexes System unspezifischer und spezifischer Abwehrmechanismen entstanden, das als angeborene bzw. erworbene Immunität bezeichnet wird.

Die angeborene Immunität ist die Reaktionsfähigkeit eines Organismus gegen eine Vielzahl von Erregern, wobei die resultierende Immunreaktion und deren Ablauf konstant sind, unabhängig von Erregertyp oder Anzahl der Expositionen mit dem Erreger.

Die erworbene oder adaptive Immunität führt nach Kontakt mit dem entsprechenden Erreger zu einem „Lernprozess“ des Immunsystems. Zentrales Merkmal der adaptiven Immunität ist die beschleunigte und verstärkte Reaktion des Immunsystems nach Zweitkontakt mit dem gleichen Erreger, welches zur Abschwächung oder dem völligen Fehlen der Krankheitssymptome führt. Diese anamnestiche Reaktion beruht auf dem immunologischen Gedächtnis und ist Grundvoraussetzung für die Wirksamkeit von Impfungen.

Das jahrtausende alte Wissen der Chinesen, dass das Schnupfen von einem Puder aus Pockenkrusten vor einer Pockeninfektion schützt, wurde von dem Arzt Edward Jenner aufgegriffen und weiterentwickelt [JENNER 1798].

Aber erst Jahrzehnte später gewann man die Erkenntnisse über Antigene, Antikörper und Abwehrzellen.

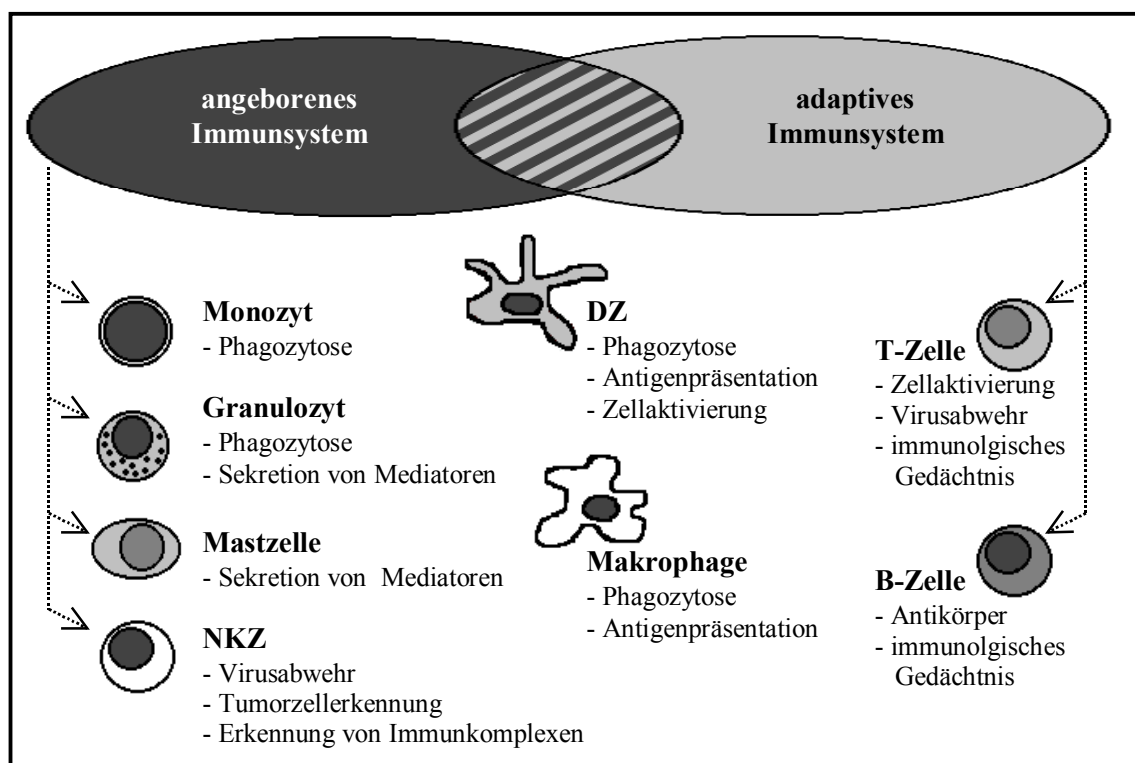


Abbildung 1: Schematische Übersicht über die beiden Teile des Immunsystems
Dargestellt sind die einzelnen Abwehrzellen beider Komponenten und ausgesuchte Funktionen dieser Zellen.
Die DZ und Makrophagen [APOSTOLOPOULOS & MCKENZIE 2001] bilden eine Brücke zwischen der angeborenen und adaptiven Immunität.

1.2 Die zellulären Bestandteile des Immunsystems

Alle Zellen des Immunsystems gehen während der Hämatopoese aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks hervor [SPANGRUDE 1991] und entwickeln sich über den myeloischen oder den lymphatischen Weg.

Aus den myeloischen Vorläuferzellen entstehen außer den Thrombozyten und Erythrozyten die zellulären Vermittler der angeborenen Immunität (Abb. 1): Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und Mastzellen. Diese Zellen unterstützen das Immunsystem durch die Phagozytose von Antigenen, Immunkomplexen und Zelltrümmern. Die Zerstörung von erkrankten, z.B. virusinfizierten Zellen erfolgt durch zellspezifische Enzyme, welche von den

Zellen des Immunsystems sezerniert werden, z.B. Lysozym durch die Granulozyten. Auch die Natürlichen Killerzellen (NKZ) sind Bestandteil der angeborenen Immunität. Sie nehmen jedoch eine Sonderstellung ein, da ihre Herkunft bis heute nicht zweifelsfrei geklärt ist. Eine Urform der NKZ wurde bereits bei *Botryllus schlosseri*, einer marinen Seescheide beschrieben [KHALTURIN et al. 2003].

Aus den lymphatischen Vorläuferzellen gehen die Vermittler der adaptiven Immunität hervor: T-Zellen und B-Zellen.

Die T-Lymphozyten gelangen als Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in den Thymus, differenzieren dort einerseits zu den zytotoxischen T-Zellen und andererseits zu den T-Helfer-Zellen (T_H -Zellen). Um ihre Funktionen im Immunsystem erfüllen zu können, benötigen die T-Lymphozyten die Unterstützung von akzessorischen Zellen, den Antigen-präsentierenden Zellen (APZ). Die APZ sind ein zentraler Bestandteil des Immunsystems. Die dazu gehörenden B-Zellen, Dendritischen Zellen (DZ) und Makrophagen verarbeiten aufgenommene Antigene und präsentieren diese im Kontext mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex-I (MHC-I, Major Histokompatibility Complex) den antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen oder mit MHC-II den T_H -Zellen.

Die zytotoxischen T-Zellen können durch Lyse der Zielzellen direkt agieren, während die T_H -Zellen eine unterstützende Funktion im Immunsystem einnehmen. Dabei wurden multiple T_H -Formen beschrieben. T_H0 -Zellen [MOSMANN & SAD 1996] werden T_H -Zellen nach Stimulation mit einem Antigen genannt. Aus ihnen entstehen dann die T_H1 - oder T_H2 -Zellen, welche unterschiedliche Spektren an Zytokinen produzieren. T_H1 ist charakteristisch bei der Elimination von intrazellulären Pathogenen und fördert durch die Produktion der Zytokine Interferon-gamma ($IFN-\gamma$), Tumor-Nekrosis-Faktor-alpha ($TNF-\alpha$) und IL-2 [PULENDRAN et al. 1999] die Aktivierung von Makrophagen. Unkontrolliert können diese Reaktionen zu Gewebeschäden und Autoimmunerkrankungen führen. T_H2 -Zellen sind hauptsächlich bei der Stimulation von B-Zellen beteiligt und werden durch die Produktion von IL-4, IL-6 [ROMAGNANI 1997] und IL-10 charakterisiert. Fehlsteuerungen in diesem System können Allergien (z.B. chronisches Asthma oder allergische Rhinitis) verursachen. Außerdem wurden T_H3 -Zellen beschrieben, welche durch die Produktion von Transformierenden Wachstumsfaktor-beta ($TGF-\beta$) regulatorisch auf reaktive T-Zellen wirken [WEINER 2001].

Die B-Lymphozyten reifen im Knochenmark und benötigen zwei Signale für ihre Aktivierung. Das erste kommt durch die Bindung des Antigens an die B-Zellen und das zweite über die T_H-Zellen. Dies führt zur Proliferation und Differenzierung der B-Zellen in Plasma- oder Gedächtniszellen. Während Plasmazellen große Mengen antigenspezifischer Antikörper produzieren, speichern Gedächtniszellen die Informationen über ein bereits bekanntes Antigen. Aus diesem Grund erfolgt die Immunantwort bei einer Zweitinfektion mit dem gleichen Antigen schneller und wirkungsvoller. Dies erklärt auch, warum aktive Impfungen Erfolg haben.

Unter den APZ zählen Makrophagen und DZ sowohl zum angeborenen als auch zum adaptiven Immunsystem und verbinden somit diese beiden Teile. Die DZ weisen jedoch besondere Eigenschaften auf und werden im Folgenden detaillierter vorgestellt.

1.2.1 Die Dendritischen Zellen

Paul Langerhans beschrieb 1861 erstmalig einen neuen Zelltyp in der menschlichen Epidermis mit dendritischer Morphologie und ordnete diese zunächst dem Nervensystem zu [LANGERHANS 1868]. Eine nähere Charakterisierung der sogenannten Langerhans-Zellen (LZ) erfolgte 1961 als Birbeck in ihnen eine Struktur entdeckte, die nach ihm Birbeck-Granula benannt wurde [BIRBECK et al. 1961]. Diese Granula sind heute ein spezifisches Nachweiskriterium für LZ [WOLLENBERG et al. 1996] und spielen bei der Antigenprozessierung und –präsentation eine Rolle [VALLADEAU et al. 2000]. Der eigenständige Name „Dendritische Zelle“ wurde erst ein Jahrhundert nach der Entdeckung von Langerhans auf Grund ihres charakteristischen Erscheinungsbild (Dendron, griechisch = der Baum) geprägt [STEINMAN & COHN 1973]. Heute ist bekannt, daß diese Zellen eine heterogene Gruppe der effektivsten APZ umfassen, welche nahezu über den gesamten tierischen Organismus einschließlich der lymphatischen Gewebe (z.B. Lymphknoten, Milz und Thymus), den Körperoberflächen wie Haut und Schleimhaut der Atemwege [HOLT et al. 1990] und des Darmes [PAVLI et al. 1993], den Bindegeweben und im Blut [FREUDENTHAL & STEINMAN 1990] sowie in der Synovialis [MASSARD et al. 1996] verteilt sind.

Die Funktion der DZ kann in drei Teilbereiche gegliedert werden: Die Antigenaufnahme, die Antigenprozessierung und die Antigenpräsentation. Die daraus resultierende antigenabhängige

Immunantwort kann durch weitere Faktoren, z.B. die Produktion von Interleukinen, beeinflusst werden (siehe 1.2.2).

Bei den DZ der Peripherie handelt es sich um unreife DZ [ROMANI et al. 1989a] mit effizienten Mechanismen zur Aufnahme von Antigenen. Dabei kann es sich sowohl um gelöste Proteine, größere Partikel, aber auch ganze Mikroorganismen handeln. DZ sind in der Lage Antigene zu präsentieren, die in pico- bis nanomolaren Konzentrationen vorliegen, während andere APZ, wie z.B. Makrophagen, eine Antigenkonzentration im mikromolaren Bereich benötigen [BANCHEREAU & STEINMAN 1998]. Die aufgenommenen Antigene werden dann prozessiert, an MHC-I oder -II gebunden und anschließend auf der Oberfläche der Zelle dauerhaft präsentiert. Während dieses Prozesses reifen DZ und verlieren ihre Fähigkeit zur Antigenaufnahme und -verarbeitung [CAUX et al. 1994 und INABA et al. 1994]. Ihre Fähigkeit Antigene T-Zellen zu präsentieren wird jedoch gesteigert [ROMANI et al. 1989b].

Die Migrationsfähigkeit von DZ [BANCHEREAU et al. 2000 und CAVANAGH & VON ANDRIAN 2002] wird über Chemokine [CAUX et al. 2000] sowie Interaktionen mit Endothelzellen [SPRINGER et al. 1994] gesteuert. Dies ist wichtig, da sich die Orte der Antigenaufnahme und der Antigenpräsentation in den meisten Fällen unterscheiden. Während Antigene überall im Körper erfasst werden, findet die Initiation einer Immunantwort der DZ durch die Aktivierung der naiven T-Zellen in den Lymphorganen statt, z.B. im Paracortex der regionalen Lymphknoten [SALLUSTO & LANZAVECCHIA 2000].

Der Begriff „natürliches Adjuvans“ als Umschreibung für DZ wurde unter anderem von der Arbeitsgruppe um Shortman eingeführt [SHORTMAN & CAUX 1997] und umfasst die Initialisierung und Verstärkung der von ihnen hervorgerufenen Immunantwort. Dies wird unter anderem durch die morphologische Struktur dieser Zellen gewährleistet. Aufgrund ihrer Ausläufer und Auffaltungen verfügen DZ über eine große Oberfläche und können somit gleichzeitig und über einen längeren Zeitraum mit mehreren T-Zellen in Kontakt treten. Außerdem produzieren reife DZ Adhäsions- und kostimulatorische Moleküle, welche einerseits die Bindung zwischen den DZ und den T-Zellen verstärken und andererseits die essentiellen Aktivierungssignale vermitteln. Diese Signale setzen sich aus zwei Teilsignalen zusammen: 1. der Antigen-MHC Komplex und 2. kostimulierende Moleküle wie CD80 und CD86. Darüber hinaus sezernieren reife DZ zahlreiche Zytokine, z.B. Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-12, IL-15 und IL-18, welche die Art der entstehenden Immunantwort beeinflussen

[BANCHEREAU et al. 2000]. Eine wichtige Rolle wird auch von einer DZ-Population im Thymus übernommen. Diese DZ in der Medulla sind bei der Entwicklung von T-Zellen für die negative Selektion autoreaktiver T-Zellen verantwortlich [ARDAVIN et al. 1993] und verhindern dadurch Autoimmunreaktionen. Der Vorgang wird als zentrale Toleranz bezeichnet.

Daneben induzieren DZ auch die so genannte periphere Toleranz in den sekundären Lymphorganen. Dabei präsentieren die DZ Selbstantigene aus den körpereigenen Geweben wie z.B. Peptide von apoptotischen Zellen [ALBERT et al. 1998] und induzieren unter diesen Umständen anergische oder tolerante T-Zellen [ADLER et al. 1998] oder die Deletion autoreaktiver T-Zellen [KURTS et al. 1997].

Die Entscheidung, ob eine DZ Toleranz erzeugt oder eine Immunantwort auslöst, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Unter pathogenfreien Bedingungen wandern DZ kontinuierlich aus der Peripherie in die Lymphorgane ein, ohne dabei terminal auszureifen. Die in der Peripherie aufgenommenen Selbstantigene werden T-Zellen präsentiert [SHORTMAN 2000 und STEINMAN et al. 2000]. Bei diesem Vorgang differenzieren naive T-Zellen in IL-10 produzierende T-Suppressorzellen, so dass eine Immunantwort gegenüber Selbstantigenen ausbleibt und Toleranz entsteht.

DZ bilden daher ein kontrollierendes Element, das die adaptiven und angeborenen Immunreaktionen verbindet.

1.2.2 Untergliederung der Dendritischen Zellen

Zur Untersuchung immunologischer Fragestellungen wird häufig die Maus (*Mus musculus*) als Modellsystem verwendet. Sie ermöglicht durch Induktion spezifischer Gendefekte viele im Humansystem gewonnene Erkenntnisse auf molekularer Ebene gezielt zu untersuchen. Deshalb wird im Folgenden diese Tierart im Vordergrund der Betrachtungen stehen.

Im Gegensatz zu humanen DZ tragen die DZ der Maus alle ein gemeinsames Oberflächenmolekül: CD11c, ein zur Integrinfamilie gehörendes Oberflächenprotein [METLAY et al 1990]. Dieses kann im Maus-System in Kombination mit anderen Markern als Pan-Marker für DZ verwendet werden.

DZ werden in mehrere Untergruppen unterteilt, von denen angenommen wird, daß sie sich aus lymphatischen oder myeloischen Vorläuferzellen entwickeln [PULENDRIAN et al. 1999 und MOSER et al. 2000]. Diese Untergruppen werden durch das Vorhandensein von bestimmten Oberflächenmerkmalen (Marker) und durch die von ihnen induzierten Reaktionen charakterisiert (siehe unten). *In vivo* und *in vitro* Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Entwicklung von DZ aus Vorläuferzellen kein starres System darstellt, sondern dass verschiedene Subtypen von DZ aus den gleichen Vorläuferzellen generiert werden können und die Subtypen in einander übergehen können [VREMEC et al. 2000] (Abb. 2). Lymphatische und myeloische DZ und deren Subtypen verteilen sich mit unterschiedlicher Häufigkeit in verschiedenen Regionen von Thymus, Milz, Peyerschen Plaques, Lymphknoten, Blut und nahezu allen Gewebe (Tab. 1).

Lymphatische DZ exprimieren CD8- α und CD205 auf ihrer Oberfläche (Tab. 1), aber keine myeloischen Zellmarker wie CD11b [ARDAVIN 1997]. Sie sind in den T-Zell-Arealen der weißen Pulpa lokalisiert und werden als interdigitierende Zellen bezeichnet. Auch die Mehrheit der DZ im Thymus und in den interfollikulären, T-Zell-reichen Regionen der Peyerschen Plaques [IWASAKI & KELSALL 2001] werden dieser Untergruppe zugeordnet. DZ der lymphatischen Reihe induzieren vorrangig eine T_H1 -Antwort (siehe 1.2).

Tabelle 1: Verteilung der DZ-Subtypen der Maus in lymphatischen Geweben [SHORTMAN & LIU 2002]

Marker	lymphatische DZ	myeloische DZ	myeloische DZ	myeloische DZ	LZ
	CD4 ⁻ CD8a ⁺⁺ CD11b ⁻ CD205 ⁺⁺	CD4 ⁺ CD8a ⁻ CD11b ⁺ CD205 ⁻	CD4 ⁻ CD8a ⁻ CD11b ⁺ CD205 ⁻	CD4 ⁻ CD8a ⁻ CD11b ⁺ CD205 ⁺	CD4 ⁻ CD8a ⁽⁺⁾ CD11b ⁺ CD205 ⁺⁺
% aller DZ in					
Milz	23	56	19	< 4	< 1
Thymus	70				
mesenterische Lymphknoten	19	4	37	26	< 4
subkutane Lymphknoten	17	4	17	20	33

In allen lymphatischen Organen existiert noch ein weiterer DZ-Subtyp, die plasmazytoiden DZ.

Die Entscheidung, ob eine T_H1 - oder eine T_H2 -Antwort induziert wird, hängt dabei maßgeblich von IL-12 ab, welches von den DZ sezerniert wird und die Differenzierung von IFN- γ produzierenden Zellen induziert [DE BECKER et al. 1998].

Die erhöhte Produktion von IL-12 ist dabei mit der Sensitivierung von T_H1-Lymphozyten verbunden [KOCH et al. 1996 und O’GARRA 1998].

Untersuchungen deuten darauf hin, dass lymphatische DZ auch regulatorische Funktionen im Immunsystem übernehmen, da diese einerseits die negative Selektion im Thymus übernehmen (siehe 1.2.1) und andererseits in den T-Zell-Regionen der Lymphknoten andere abgestorbene DZ nach der Antigenpräsentation phagozytieren [STEINMAN & INABA 1999] und auf diese Weise die initiierte Immunantwort zeitlich begrenzen.

Myeloische DZ stellen die klassischen APZ des Immunsystems dar. DZ, welche *in vitro* aus hämatopoetischen Vorläuferzellen unter dem Einfluss von GM-CSF generiert werden können [INABA et al. 1992 und LUTZ et al. 1999], entsprechen den myeloischen DZ *in vivo*. Diese DZ exprimieren CD11b, aber kein CD8- α (Tab. 1) und befinden sich in der Marginalzone zwischen der roten und weißen Pulpa. Sie wandern nach einem Stimulus, z.B. LPS [DE SMEDT et al. 1996] in die T-Zellbereiche ein. Die myeloischen DZ der Milz können wiederum in zwei Teilgruppen unterschieden werden, die CD4 negativen und die CD4 positiven DZ [VREMEC et al. 2000]. In den Lymphknoten residieren die myeloischen DZ in der parakortikalen Region und in der Nähe der subkapsulären Sinii, während sie in den Peyerschen Plaques in der subepithelialen Dom-Region und im Interfollikular-Raum residieren.

Die myeloischen DZ produzieren *in vitro* nach Zugabe eines Antigen-Stimulus (z.B. *Staphylococcus aureus*) oder IFN- γ und löslichem CD40-Ligand-Trimer große Mengen an IL-10 und induzieren, in Kokultorexperimenten mit Ovalbumin-spezifischen naiven T_H-Zellen, selektiv die Produktion von IL-4 und IL-10, beides Zytokine einer TH₂-Antwort [IWASAKI & KELSALL 2001].

Eine Sonderstellung hinsichtlich ihrer Ontogenese nehmen die plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDZ) ein (Abb. 2). Im humanen System wurden sie im peripheren Blut [O’DOHERTY et al. 1994], in den Tonsillen [GROUARD et al. 1997] und im Thymus [VANDENABEELE et al. 2001] beschrieben. Diese exprimieren das Oberflächenmolekül CD4 aber kein CD11c. Die pDZ der Maus tragen im Gegensatz dazu CD11c, den B-Zell-Marker B220 [OKADA et al. 2003] und den Granulozyten-Marker GR-1 [NAKANO et al. 2001], aber kein CD4 oder CD8- α und kommen im Thymus, in der Milz, im Knochenmark [ASSELIN-PATUREL et al. 2001], im Blut und in den Lymphknoten [NAKANO et al. 2001] vor.

Obwohl die pDZ von Mensch und Maus phänotypisch sehr unterschiedlich sind, sind sie in beiden Organismen die Hauptproduzenten von Typ-I-Interferon [CELLA et al. 1999 und MARTIN et al. 2002] und ihnen wird eine wichtige Rolle bei der Virenabwehr und Toleranzinduktion (siehe 1.2.1) durch Interaktionen mit regulatorischen T-Zellen zugeschrieben.

In den Lymphknoten treten neben den Subpopulationen, die für die Milz beschrieben wurden noch zwei weitere Gruppen von DZ auf, welche aus den umliegenden Geweben wie Haut oder Darm eingewandert sind [HENRI et al. 2001 und IWASAKI & KELSALL 2001].

Hierbei umfassen die LZ in den subkutanen Lymphknoten ca. ein Drittel aller DZ [SHORTMAN & LIU 2002], während sie in den mesenterischen Lymphknoten nur vereinzelt auftreten (siehe Tab. 1).

1.2.3 Die Dendritischen Zellen der Epidermis

Die Zuordnung der LZ ist von Widersprüchen geprägt. Während man LZ aufgrund starker Expression von CD11b und fehlendem CD8- α zunächst zu den myeloischen DZ zählte, zeigten spätere Experimente, dass LZ und andere DZ, während sie reifen und zu den Lymphknoten wandern, CD8- α hochregulieren, was die Zuordnung zu einer der beiden Subpopulationen erschwert [TRAVER et al. 2000 und DEL HOYO et al. 2002]. Auch das Vorhandensein des Oberflächenmoleküls CD205 auf LZ deutet auf einen lymphatischen Ursprung hin.

Neuere Arbeiten postulieren außerdem, dass die LZ in der Haut während der Homeostase nicht über Vorläuferzellen des Knochenmarks gebildet, sondern dass Verluste durch ausgewanderte oder abgestorbene LZ durch Teilung der verbliebenen Zellen ausgeglichen werden [MERAD et al. 2002]. Erst durch einen massiven Stimulus (z.B. UV-Strahlung) und dem daraus resultierenden verstärkten Auswandern der aktivierten LZ kommt es zu einem Einstrom von unreifen DZ aus dem Blut.

Dies und die Tatsache, dass LZ die einzigen DZ sind, die in der äußersten Schicht der Haut vorkommen, während alle anderen DZ unterhalb der Epithelien oder in lymphatischen Organen existieren, verdeutlichen ihre Sonderstellung im Immunsystem. Außerdem besitzen LZ ein besonderes Zellorganell, die Birbeck-Granula (siehe auch 1.2.1). Ein weiteres

Charakteristikum ist die Expression von Langerin, ein Transmembranprotein, das für die Bildung der Birbeck-Granula wichtig ist. Über Antikörper gegen Langerin, auch als CD207 bezeichnet, können LZ von dermalen DZ unterschieden werden. Als eindeutiges Kriterium für LZ kann aber auch Langerin nicht uneingeschränkt eingesetzt werden, da z.B. auch in der Milz und Thymus CD207 positive Zellen beobachtet wurden [VALLADEAU et al. 2002].

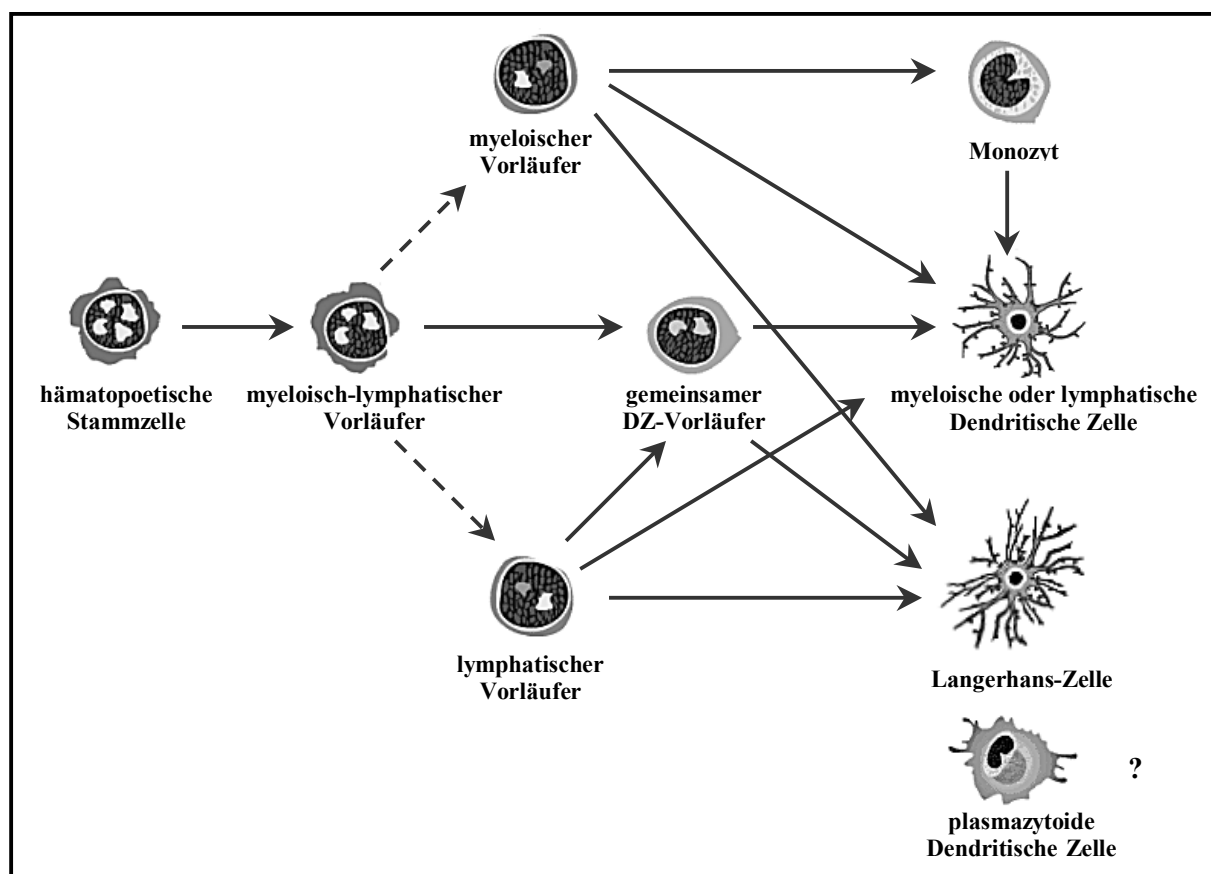


Abbildung 2:

Beziehungen zwischen der Entwicklung von DZ der lymphatischen und myeloischen Reihe (modifiziert nach ARDAVIN et al. 2001). Verschiedene und kontroverse Entwicklungsrichtungen der DZ sind noch hypothetisch (unterbrochene Pfeile) oder konnten experimentell bereits nachgewiesen werden (durchgehende Pfeile).

1.2.4 Die *In vitro* Generation von Dendritischen Zellen

Obwohl DZ in fast allen Körpergeweben zu finden sind, stellen sie dennoch nur eine Minderheit dar. In der Maus sind DZ mit etwa einem Prozent in den lymphatischen Geweben und mit 4% (LZ) in der Epidermis vertreten [STEINMAN et al. 1980]. Um die Funktionen von DZ besser untersuchen und verstehen zu können, ist es notwendig mit isolierten Zellen zu arbeiten. Daher wurden Isolationsmethoden entwickelt um DZ, z.B. aus der Haut oder den Lymphorganen, zu isolieren [ROMANI et al. 1989a und SCHULER & KOCH 1991] oder verschiedene Subtypen von DZ aus pluripotenten Vorläuferzellen aus dem Knochenmark oder Blut zu generieren [INABA et al. 1992 und LUTZ et al. 1999]. Der Einsatz und die Kombination von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen beeinflusst dabei die Entwicklungsrichtung der DZ. Die Kultivierung von hämatopoetischen Zellen unter der Zugabe von Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) mit und ohne IL-4 sowie der anschließenden Reifung durch TNF- α führt zu DZ, welche dem myeloischen Phänotyp entsprechen [INABA et al. 1992 und SCHREURS et al. 1999]. Die Generation von Langerhans-ähnlichen Zellen *in vitro* ist durch eine Kultivierung von pluripotenten Vorläuferzellen mit GM-CSF plus TGF- β möglich [ZHANG et al. 1999]. Bisher ist es noch nicht gelungen lymphatische DZ aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks zu generieren. Funktionelle Untersuchungen mit diesen DZ erfordern ihre Isolation aus lymphatischen Geweben, z.B. der Milz [VREMEC et al. 1992] oder die Isolation von DZ-Vorläuferzellen [MARTIN et al. 2000].

Mit *in vitro* generierten Zellen können Funktionsanalysen und Untersuchungen wichtiger Stoffwechselwege durchgeführt werden, welche für das Verständnis von Entzündungsprozessen und der Regulation des Immunsystems wichtig sind.

1.3 Grundlagen der Lipoxxygenase-Stoffwechselwege

Die Elemente der angeborenen und der adaptiven Immunität interagieren miteinander in vielfältiger Weise. Immunzellen kommunizieren miteinander mittels Adhäsionsmolekülen auf den Zelloberflächen, über Antikörper, Zytokine und Entzündungsmediatoren (z.B. Komplementsystem und Lipidmediatoren wie Prostaglandine und Leukotriene).

Die Mediatoren werden dabei über komplexe Stoffwechselwege und Enzymreaktionen zur Verfügung gestellt. Einer dieser Wege ist der Lipoxxygenasestoffwechselweg. Die Entdeckung der Lipoxxygenasen (LOx) erfolgte in den 70er Jahren durch eine schwedische Arbeitsgruppe [HAMBERG & SAMUELSSON 1974]. Bei diesen Enzymen handelt es sich um Dioxygenasen mit nicht-hämgebundenen Eisen im aktiven Zentrum. Sie katalysieren die Peroxidation freier oder veresterter mehrfach ungesättigter Fettsäuren und bilden als Primärprodukte Hydroperoxysäuren. Die positionsspezifische Oxidation der Kohlenstoffkette des Substrates dient als Basis für die Nomenklatur der LOx (3-, 5-, 8-, 12- und 15-LOx) und wird durch die zell- oder gewebespezifische Herkunft ergänzt, wenn mehr als eine positionsspezifische LO derselben Spezies charakterisiert werden konnte (siehe Tab. 2). Hauptsubstrat der meisten LOx ist die Arachidonsäure, eine mehrfach ungesättigte Fettsäure. Diese ist die häufigste C₂₀-Fettsäure in Phospholipiden von Säugetieren und wird einerseits über die Nahrung aufgenommen oder andererseits in bestimmten Zellen, z.B. der Leber, aus der essentiellen Linolensäure gebildet.

Heute sind über 50 verschiedene LOx bekannt, die in Vertebraten, Algen, Pilzen und höheren Pflanzen [YAMAMOTO et al. 1992] weit verbreitet sind, aber in meisten Bakterien und Hefen fehlen [Übersicht in BRASH 1999 und KÜHN & THIELE, 1999].

Die erste LO wurde 1947 aus Sojabohnen isoliert [THEORELL et al. 1947] und später um drei weitere LOx in dieser Spezies ergänzt [SHIBATA et al. 1987]. Die erste im Tierreich identifizierte LO war eine 12-LO und wurde aus den Blutplättchen von Rindern isoliert und ergänzend Thrombozyten-typisch genannt.

Tabelle 2: Übersicht über einige ausgewählte Lipoxygenasen von Säugetieren, Vorkommen und Krankheiten oder Vorgänge bei denen ein Einfluss dieser Enzyme oder deren Produkte diskutiert wird

Lipoxygenase	Vorkommen	Wirkung	Referenzen
3-Lipoxygenase	Haut	?	KINZIG et al. 1999 JOBARD et al. 2002
5-Lipoxygenase	polymorphkernige Leukozyten humane B-Zellen Langerhans-Zellen	Allergien Arteriosklerose Asthma bronchiale rheumatoide Arthritis Psoriasis	BORGEAT et al. 1976 JAKOBSSON et al. 1995 KUWABARA et al. 2000 CHEN et al. 1994 SPANBROEK et al. 1998 und 2000 / 2003
12-Lipoxygenase Epidermis-typisch	Haut	antikarzinogen	VAN DIJK et al. 1995 FUNK et al. 1996
Thrombozyten-typisch	Thrombozyten	Asthma bronchiale Arteriosklerose Morbus Parkinson Tumorangiogenese	YAMAMOTO et al. 1992 TOH et al. 1992 HONN et al. 1994
Leukozyten-typisch	Leukozyten	Diabetes mellitus Typ II	TAKAHASHI et al. 1988 BLEICH et al. 1998
15-Lipoxygenase Isoform 1	Retikulozyten	Membranabbau Reifung von Erythrozyten (<i>in vitro</i>)	RAPOPORT et al. 1979 SCHEWE & KÜHN 1991
Isoform 2 (= 8-LO der Maus)	Haut Kornea Lunge Prostata	antikarzinogen	BRASH et al. 1997 BHATIA et al. 2003 SHAPPELL et al. 1999

1.3.1 Die 5-Lipoxygenase

Einer der am besten charakterisierten Vertreter der Lipoxygenasen ist die 5-LO. Dieses Enzym wurde zuerst in polymorphkernigen Leukozyten des Kaninchens beschrieben [BORGEAT et al. 1976]. Jahre später wurde die 5-LO auch im Menschen [ROUZER & SAMUELSSON 1985] und in der Maus [CHEN et al. 1995] charakterisiert.

Die humane 5-LO wird *in vivo* im Wesentlichen von Zellen myeloischen Ursprungs exprimiert [STEINHILBER 1994]. Eine Ausnahme bilden die B-Zellen, welche 5-LO produzieren und zur lymphatischen Reihe gehören [JAKOBSSON et al. 1992].

Die 5-LO verstoffwechselt hauptsächlich freie Fettsäuren. Die freie Konzentration an intrazellulärer Arachidonsäure ist im Normalfall sehr gering. Durch die zytosolische Phospholipase A₂ [YAMAMOTO et al. 1991] kann Arachidonsäure nach einem Stimulus (z.B. TNF- α , IL-1 und Bradykinin) schnell aus den Zellmembranen der Zelle hydrolysiert und somit freigesetzt werden [ANTHONSEN et al. 2001 und LAL et al. 1997]. Dieser Stimulus kann endogen durch Hormone oder Wachstumsfaktoren oder exogen z.B. durch Verwundung erfolgen [MARKS & FÜRSTENBERGER 1983].

Die Funktion der 5-LO hängt dabei von dem integralen Kernmembranprotein Fünf-Lipoxygenase-Aktivierendes Protein (FLAP) ab [MILLER et al. 1990]. Dessen Aufgabe die Bindung freier Arachidonsäure und der Transfer der Fettsäure an die Substratbindungsstelle der 5-LO ist [Übersicht in PETERS-GOLDEN 1998]. Als Voraussetzung für diesen Vorgang wird eine Translokation der 5-LO und der Phospholipase A₂ zur Kernmembran nach Aktivierung der Zelle angenommen.

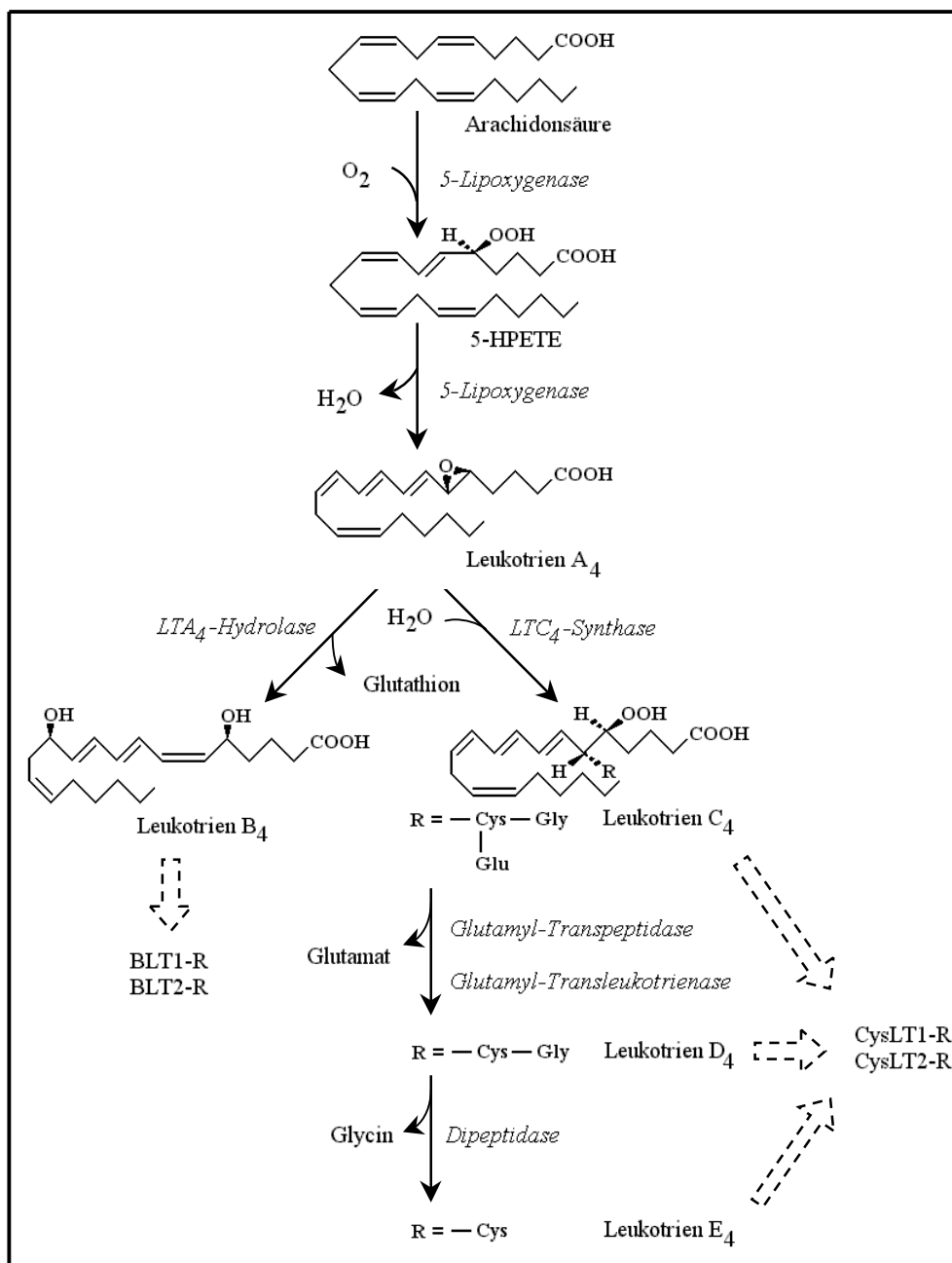


Abbildung 3: Der 5-Lipoxygenase-Stoffwechselweg, seine Konstituenten und Rezeptoren
 Nach Hydrolyse durch die Phospholipase A_2 wird die freie Arachidonsäure durch die Dioxygenase-Aktivität der 5-LO zu 5-HPETE oxidiert und anschließend durch ihre Synthaseaktivität zu LTA_4 dehydriert. Dieses wird entweder über die LTA_4 -Hydrolase zu LTB_4 oder, über LTC_4 -Synthase zu LTC_4 , mit Glutathion konjugiert. Das entstandene Leukotrien kann dann über eine γ -Glutamyltranspeptidase zu LTD_4 und weiter über eine Dipeptidase zu LTE_4 metabolisiert werden. LTB_4 und die Cys-LT LTC_4 , LTD_4 und LTE_4 wirken über zwei verschiedene Gruppen an Rezeptoren.

1.3.2 Die Leukotriene und ihre Rezeptoren

Arachidonsäure ist das wichtigste Substrat für die Synthese biologisch aktiver oxygenierter Fettsäuren, der Lipidmediatoren. Zu ihnen werden Leukotriene (LT), Prostaglandine, Thromboxane und Lipoxine gezählt und aufgrund ihres C₂₀-Grundgerüsts als Eikosanoide zusammengefasst [HENDERSON et al. 1991]. Die Synthese der Eikosanoide erfolgt *de novo* aus Membranphospholipiden über ein enzymatisch geregeltes Netzwerk, zu dessen Mitgliedern auch die Lipoxygenasen zählen.

Die 5-LO setzt die Arachidonsäure zunächst in 5-Hydroperoxyeicosatetraensäure (5-HPETE) und dann in einem zweiten Schritt zu dem instabilen Epoxid Leukotrien A₄ (LTA₄) um [SHIMIZU et al. 1984] (Abb. 3). Die weitere Umsetzung von LTA₄ erfolgt über 5-LO-unabhängige Reaktionen [IVERSEN & KRAGALLE 2000] und führt zur Bildung weiterer biologisch hoch aktiven LT. LTA₄ kann über zwei verschiedene Stoffwechselwege metabolisiert werden (siehe Abb. 3): 1. Durch die LTA₄-Hydrolase, deren Produkt Dihydroxy-Leukotrien B₄ (LTB₄) ist [RÅDMARK et al. 1984]; 2. Über Konjugation mit Glutathion durch die LTC₄-Synthase [PENROSE et al. 1992] bei der Cysteinyl-Leukotrien C₄ (LTC₄) gebildet wird. Über die Abspaltung von Glutamat durch eine γ -Glutamyltranspeptidase kann LTC₄ zu LTD₄ metabolisiert werden [ANDERSON et al. 1982] und über eine weitere Abspaltung von Glycin durch eine Dipeptidase zu LTE₄ [LEE et al. 1983] (Abb. 3).

Die LT wurden bisher *in vivo* meist im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen, Allergien und Autoimmunerkrankungen beschrieben. Sie sind in die Vermittlung verschiedener Entzündungsvorgänge involviert, z.B. Asthma bronchiale [LEWIS & ROBIN 1985], Psoriasis [RUZICKA et al. 1986], rheumatoide Arthritis [GRIFFITHS et al. 1997] und einem Modell der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis [GLADUE et al. 1996]. Auch bei der Entstehung von Gefäßerkrankungen wie Arteriosklerose [SPANBROEK et al. 2003 und MEHRABIAN et al. 2002] und Aneurismen [ZHAO et al. 2004] wird eine Funktion der LT diskutiert. Über ihre Funktionen im gesunden Organismus ist nur sehr wenig bekannt.

Alle LT üben ihre spezifische biologische Aktivität über G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), die sieben membranüberspannende Domänen enthalten, aus.

LTB₄ wird unter anderem in polymorphkernigen Leukozyten [BARGEAT & SAMUELSSON 1979], Mastzellen [LEWIS et al. 1982] und Makrophagen [FELS et al. 1982] gebildet und ist

Auslöser für die Chemokinese und Chemotaxis von Neutrophilen, Eosinophilen, Makrophagen. Außerdem führt die Ausschüttung von LTB₄ zur Freisetzung von Peroxiden und lysosomalen Enzymen [REISS et al. 1998] und zu einer gesteigerten Produktion von Interleukinen, z.B. IL-6 [BRACH et al. 1992]. LTB₄ mediiert außerdem die gesteigerte Adhärenz und Aggregation von neutrophilen Granulozyten an vaskulären Endothelzellen [SAMUELSSON et al. 1987, 1989 und CLAEISSON 1999] und die initiale Rekrutierung von Effektor-T-Zellen [TAGER et al. 2003, GOODARZI et al. 2003 und OTT et al. 2003].

Für LTB₄ sind zwei Rezeptoren, BLT₁-R und BLT₂-R [YOKOMIZO et al. 1997, 2001 und WANG et al. 2000] bekannt.

Der BLT₁-R weist eine 20fach stärkere Bindungsaffinität [YOKOMIZO et al. 2000] für LTB₄ als der BLT₂-R auf und wird im Menschen besonders in Leukozyten [KAMOHARA et al. 2000], im Herz, in den Skelettmuskeln [TRYSELIUS et al. 2000] und in den Lymphorganen wie Thymus und Milz exprimiert. In Gehirn und Leber [WANG et al. 2000] ist dieser Rezeptor ebenfalls exprimiert. In der Maus wurde dieser Rezeptor in Eosinophilen nachgewiesen [HUANG et al. 1998].

Der zweite Rezeptor für LTB₄, BLT₂-R, ist ubiquitär in vielen Körperregionen zu finden.

Durch den Einsatz von Rezeptorantagonisten ließ sich der Einfluss von BLT₁-R und BLT₂-R auf das Immunsystem *in vitro* [MORITA et al. 1999] und ihre Teilnahme an Entzündungsprozessen, z.B. in der rheumatoiden Arthritis *in vivo* [KUWABARA et al. 2000] nachweisen.

Die Cysteinyl-Leukotriene (CysLT) LTC₄, LTD₄ und LTE₄ sind auch unter der Bezeichnung „slow reacting substance of anaphylaxis“, kurz SRS-A, bekannt [MURPHY et al. 1979] und sind Mediatoren bei hypersensitiven Reaktionen, z.B. bei Asthma bronchiale [LAM et al. 1988], wobei sie die Schleimsekretion steigern und die Kontraktion und Proliferation von glatten Muskelzellen in der Lunge erhöhen [WEISS et al. 1982 und BROOKS & SUMMERS 1996].

Auch für die CysLT sind zwei Rezeptoren beschrieben worden. Der CysLT₁-R und CysLT₂-R [SARAU et al. 1999 und HEISE et al. 2000] weisen wie der BLT₁-R und BLT₂-R für die einzelnen LT unterschiedliche Bindungsaffinitäten auf.

Der CysLT₁-R weist die höchsten Konzentrationen in der Milz und den peripheren Blutleukozyten auf. Der Rezeptor ist aber auch in der Lunge, hier besonders in glatten

Muskelzellen und Gewebemakrophagen [LYNCH et al. 1999 und FIGUEROA et al. 2001], im Herz, Pankreas und im Darm verbreitet [SARAU et al. 1999].

Der CysLT₂-R kommt in interstitiellen Lungenmakrophagen, peripheren Blutleukozyten, wie Eosinophile, der Milz, im Herz und in bestimmten Regionen des zentralen Nervensystems vor [HEISE et al. 2000]. Für diesen Rezeptor wird eine Rolle bei der Blutdruckregulation diskutiert [HUI et al. 2004]. Außerdem konnte CysLT₂-R im Gegensatz zum CysLT₁-R in Endothelzellen der humanen Umbilikalvene (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells) nachgewiesen werden [LÖTZER et al. 2003].

Beide CysLT-R wurden auch in der Maus identifiziert [MAEKAWA et al. 2001 und OGASAWARA et al. 2002]. Der murine CysLT₁-R kommt in zwei Isoformen vor, welche durch alternatives Spleißen entstehen [MAEKAWA et al. 2001] und wird besonders in Lunge, Haut und Dünndarm exprimiert. In Gegensatz zum humanen CysLT₁-R konnte der Rezeptor in der Maus nicht in der Milz nachgewiesen werden [MAEKAWA et al. 2001]. Der murine CysLT₂-R ist ubiquitär verteilt und wird besonders stark in der Milz, der Lunge und dem Dünndarm exprimiert [OGASAWARA et al. 2002].

Therapeutisch werden CysLT₁-R Antagonisten wie Montelukast (Singulair™) und Zafirlukast (Accolate™), bereits bei der Behandlung von Asthma bronchiale [JONES et al. 1995 und REISS et al. 1998] und Heuschnupfen [PULLERITS et al. 1999] eingesetzt.

1.4 Die 5-Lipoxygenase und Dendritische Zellen

Die 5-LO und deren Stoffwechselprodukte spielen sowohl in der zellulären als auch in der humoralen Immunität eine wichtige Rolle [CHEN et al. 1994]. Dabei beeinflussen sie besonders die Initiation und die ersten Schritte der Immunreaktionskaskade [BANCHEREAU & STEINMAN 1998 und FUNK et al. 1998].

In der Epidermis des Menschen exprimieren LZ die Konstituenten des 5-LO Stoffwechselweges (5-LO, FLAP, LTA₄-Hydrolase und LTC₄-Synthase) [SPANBROEK et al. 1998]. In DZ im Paracortex von humanen Lymphknoten wurde auch die 5-LO nachgewiesen. Die 5-LO Expression konnte ebenfalls *in vitro* während der Differenzierung von DZ aus hämatopoetischen Vorläuferzellen gezeigt werden. Außerdem steigerte die Zugabe von TGF- β die Expression von 5-LO und FLAP in diesen Zellen und die Produktion von LTB₄ und 5-HETE konnte durch Stimulation mit Kalzium-Ionophor angeregt werden [SPANBROEK et al. 2000 und 2001].

CysLT werden als Schlüsselmediatoren bei pathologischen Vorgängen, wie bei Asthma bronchiale [LAM et al. 1988] oder Psoriasis [LEWIS et al. 1990] verantwortlich gemacht. Die molekularen Mechanismen wurden jedoch bis heute nicht identifiziert. Erste Hinweise, dass LT die adaptiven Immunreaktionen beeinflussen können, konnten durch die Generierung von 5-LO defizienten Mäusen erbracht werden. 5-LO defiziente Mäuse, die in einem Ovalbumin induzierten Asthmadel eingesetzt wurden, zeigten nur verminderte Immunantworten, gemessen am Spiegel von Immunglobulin E und Ovalbumin-spezifischen Immunglobulin G [IRVIN et al. 1997].

Andere Untersuchungen z.B. mit B-Lymphozyten zeigten, dass LTB₄ einen Effekt auf die Aktivierung und Differenzierung dieser Zellen steigerte [YAMAOKA et al. 1989 und 1994]. Eine Funktion der 5-LO in der DZ-Biologie konnte erstmals durch die Arbeitsgruppe von Robbiani, indirekt durch Migrationsdefekte von DZ in Mäusen mit genetischen Veränderungen, nachgewiesen werden. Bei diesen Versuchen wurde ein Membranprotein ausgeschaltet, welches unter anderem für den Transport von LTC₄ verantwortlich ist [ROBBIANI et al. 2000].

Eine weitere Verknüpfung von DZ und der 5-LO wird für die Atherosklerose diskutiert (siehe auch 1.3.2). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den Schaumzellen in

atherosklerotischen Läsionen sowohl um Makrophagen als auch um DZ handelt und die Menge an 5-LO und ihrer Konstituenten im Krankheitsverlauf anstieg [SPANBROEK et al. 2003]. Die Beobachtung, dass 5-LO bei der Entstehung der Atherosklerose im Menschen eine entscheidende Rolle spielen könnte, konnte durch Untersuchungen an 5-LO defizienten Mäusen bestätigt werden. Diese Tiere bildeten signifikant weniger atherosklerotische Läsionen aus als die Wildtypiere [MEHRABIAN et al. 2002].

1.5 Fragestellung

DZ gehören zu den wirksamsten APZ des Organismus. Die bislang am besten untersuchten DZ sind die LZ der Epidermis. Ihr Ursprung und ihre Verwandtschaft zu anderen DZ-Populationen geben immer noch Anlass zu kontroversen Diskussionen.

Die 5-LO ist eines der Schlüsselenzyme vieler Immunreaktionen. Die Mechanismen, der Ort und die Zielzellen der LT Wirkungen blieben trotz intensiver Forschung ebenso wie ihre Funktion bei der Regulation der Immunantwort bisher weitgehend ungeklärt.

Da bekannt ist, dass humane DZ 5-LO exprimieren und 5-LO Stoffwechselprodukte einen wesentlichen Einfluss auf die Modulation von Immunreaktionen haben und funktionelle Untersuchungen humaner DZ *in vivo* nur unter großem Aufwand möglich sind, sollte in der vorliegenden Arbeit versucht werden einen Zusammenhang zwischen diesen beiden Komponenten des Immunsystems in der Maus zu identifizieren. Folgende Aspekte stehen dabei im Vordergrund:

1. Identifikation 5-LO exprimierender DZ-Populationen in den peripheren Geweben und den lymphatischen Organen der Maus durch Immunfluoreszenzanalysen.
2. Funktionelle Untersuchungen von DZ durch vergleichende Analysen von 5-LO defizienten Mäusen und Kontrolltieren.
3. Nachweis der Konstituenten des 5-LO Stoffwechselweges und ihrer Rezeptoren in *in vitro* generierten DZ durch RT-PCR Analysen bzw. Nachweis der Funktionalität der LT-Rezeptoren durch intrazelluläre Kalziummessungen.

Zunächst sollte unter Zuhilfenahme 5-LO spezifischer Antiseren nachgewiesen werden, ob DZ oder Subpopulationen von DZ der Maus 5-LO exprimieren. Nach Identifikation 5-LO exprimierender DZ sollten, unter Verwendung von 5-LO defizienten Mäusen, experimentelle Ansätze entwickelt werden, die funktionelle Untersuchungen über eine Beteiligung der 5-LO an Immunreaktionen ermöglichen. Dafür werden Kontrolltiere des C57BL/6J-Mausstammes (B6) und 5-LO-defiziente Tiere des C57BL/6Alox5^{-/-} Stammes (B6Alox5^{-/-}) mit einander verglichen. Außerdem sollte versucht werden 5-LO exprimierende DZ *in vitro* zu generieren, um diese Zellen als Modellsystem für funktionelle Studien zu etablieren.

2. Material

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Agilent 2100 Bioanalyzer-System	Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA
Cytospin Kit	Shandon™, England
Cytospin-3-Zentrifuge	Shandon™, England
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Einwegskalpelle	Dahlhausen, Köln
FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Auswertesoftware CellQuest™	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluowert-Mikroskop	Leitz, Wetzlar
Gelelektrophoresesystem	Bio-Rad, München
Inkubator Steri-Cult 200	Forma Scientific, Marietta, OH, USA
inverses Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Jena
Laserscanning-Kopf LSM510	Zeiss, Jena
LSM510 Image Examiner Software	Zeiss, Jena
Invisorb Spin PCRapid Kit®	Invitek GmbH, Berlin
Kryostat – HM 500 OMV	Microm GmbH, Walldorf
LS50B Fluoreszenzspektrometer	Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt
FLWinLab Software	Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt
Küvetten, makro, Spezialglas	Neolab®, Heidelberg
Nylonfilter, 35 µm und 70 µm	Miltenyi Biotek GmbH, Bergisch Gladbach
Objektträger, Histobond™	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Omni EZ Dispergierwerkzeug	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting
PLG (phase-lock-gel) Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße 15 und 50 ml	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
RNA 6000 Nano Chip	Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA
RotorGene2000 PCR System	Corbett Research, Sydney, Australien
Rührschüttler VF2	IKA®-Laborbedarf, Staufen
Sicherheitswerkbank SterilGard Hood (Klasse II Typ A / B3)	The Baker Company, Inc. Sanford, Maine, USA
Schüttelwasserbad Julabo SW-20C	Julabo-Labortechnik GmbH, Seelbach
Silikonschaber	Nunc™, Wiesbaden
Stromversorgungsgerät	Bio-Rad, München
Thermocycler Gene Amp PCR 2400	Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt
Ultraviolettstrahler	Laborgeräte Konrad Benda, Wiesloch
Videodokumentationssystem	S & L, Heidelberg
Waage Sartorius Research	Sartorius AG, Göttingen
Waage Sartorius Universal	Sartorius AG, Göttingen

Zellkulturschalen (Petrischalen)
Zellzählgerät, Coulter Counter®
Zentrifuge Biofuge 15R
Zentrifuge GPKR
Zentrifuge Sigma 3K12
Zentrifuge 5415C

Greiner, Solingen; Falcon, Heidelberg
Coulter Electronics Limited, Luton, UK
Heraeus Sepatech, Hanau
Beckman, München
Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode
Eppendorf AG, Hamburg

2.2 Chemikalien und Lösungen

Agarose MP
Azeton
Bromphenolblau
BSA
BSA für die Molekularbiologie
Chloroform
DAPI
Dibutyl-Phthalat
Diethyl-Pyrocarnat (DEPC)
Bromphenolblau
β-Mercaptoethanol
EDTA
Ethanol
Ethidiumbromid
FACSFlow™
FITC, Isomer I
Fötales Kälberserum (FCS)
Fura-2/AM
Gelatine
Gentamycin
Glukose
Glyzerin
HBSS
HEPES
Kaliumchlorid
Kalziumchlorid
L-Glutamin
LPS
Magnesiumsulfat
Methanol
Natriumazid
Natriumchlorid
Natriumpyruvat
Paraformaldehyd
Penizillin / Streptomycin
Permafluor
PBS, ohne Ca²⁺ und Mg²⁺

Roche-Diagnostik, Mannheim
Merck, Darmstadt
Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Sigma, Deisenhofen
Roche-Diagnostik, Mannheim
Roth, Karlsruhe
Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt; Applichem, Darmstadt
Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
BD Biosciences, San Jose, USA
Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Bio Whittaker, Verviers, Belgien
Calbiochem, Bad Soden
Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Gibco™ Invitrogen Corporation, Leek, NL
Applichem, Darmstadt
Applichem, Darmstadt
Gibco™ Invitrogen Corporation, Leek, NL
Gibco™ Invitrogen Corporation, Leek, NL
Roth, Karlsruhe
Roth, Karlsruhe
Gibco™ Invitrogen Corporation, Leek, NL
Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Roth, Karlsruhe
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Roth, Karlsruhe
Invitrogen, Leek, NL
Merck, Darmstadt
Gibco™ Invitrogen Corporation, Leek, NL
Beckman, München
Gibco™ Invitrogen Corporation, Leek, NL

Sybr Green	Roche-Diagnostik, Mannheim
Tissue Tek [®]	Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
Tris Base	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Trizol [®]	Gibco™ Invitrogen Corporation, Leek, NL
Tris	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Triton-X100	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Trypsin-EDTA	Gibco™ Invitrogen Corporation, Leek, NL

2.3 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Antikörper sind in den folgenden Tabellen unter Angabe des Spenderorganismus, des Konjugats, des Klons, der Herstellerfirma und der angewandten Verdünnung zusammengefaßt.

2.3.1 primäre Antikörper

Antikörper / Konjugat	Klon	Hersteller	Verdünnung
Ratte anti-Maus B220	RA3-6B2 (IgG2a)	Pharmingen, San Jose, USA	1:100
arm. Hamster anti-Maus CD3e	145-2C11 (IgG1)	Pharmingen, San Jose, USA	1:100
Ratte anti-Maus CD8a	53-6.7 (IgG2a)	Pharmingen, San Jose, USA	1:100
Ratte anti-Maus CD11b / FITC	M1/70 (IgG2b)	Miltenyi, Bergisch- Gladbach	1:100
arm. Hamster anti-Maus CD11c	HL3 (IgG1)	Pharmingen, San Jose, USA	1:100
arm. Hamster anti-Maus CD11c / PE	HL3 (IgG1)	Pharmingen, San Jose, USA	1:100
Ratte anti-Maus CD16/CD32	2.4G2 (IgG2B)	Pharmingen, San Jose, USA	1:100
Ratte anti-Maus CD68	FA11 (IgG2a)	Serotec, Düsseldorf	1:200
arm. Hamster anti-Maus CD80 / PE	16-10A1 (IgG2)	Pharmingen, San Jose, USA	1:200
Ratte anti-Maus CD205	NLDC-145 (IgG2a)	Serotec, Düsseldorf	1:10
Ratte anti-Maus F4/80	CI:A3-1 (IgG2b)	Serotec, Düsseldorf	1:100

Antikörper / Konjugat	Klon	Hersteller	Verdünnung
Kaninchen anti-Maus 5-LO	1550 [AK7]	O. Rådmark, Stockholm, Schweden	1:10
Ratte anti-Maus GR-1	RB6-8C5 (IgG2b)	Pharmingen, San Jose, USA	1:100
Ratte anti-Maus MOMA-1	MOMA-1 (IgG2a)	Serotec, Düsseldorf	1:20
Ratte anti-Maus MHC-II (I-A / I-E)	2G9 (IgG2a)	Pharmingen, San Jose, USA	1:500
Ratte anti-Maus MHC-II / FITC	M5/114.15.2 (IgG2b)	Miltenyi, Bergisch- Gladbach	1:500
Maus anti-Human Langerin	306.G9 (IgG)	Schering-Plough, Dardilly, Frankreich	1:500

2.3.2 sekundäre Antikörper

konjugierte Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Ziege anti-arm. Hamster IgG / Cy2	Dianova, Hamburg	1:200
Ziege anti-arm. Hamster IgG / Cy5	Dianova, Hamburg	1:400
Ziege anti-Maus IgG / Cy2	Dianova, Hamburg	1:200
Ziege anti-Maus IgG / Cy3	Dianova, Hamburg	1:400
Esel anti- Kaninchen IgG / Cy3	Dianova, Hamburg	1:400
Ziege anti-Kaninchen IgG / Cy5	Dianova, Hamburg	1:400
Ziege anti-Ratte IgG / Cy2	Dianova, Hamburg	1:200
Esel anti-Ratte IgG / Cy5	Dianova, Hamburg	1:400

2.3.3 Isotypkontrollen

Isotypkontrolle / Konjugat	Klon	Hersteller	Verdünnung
Ratte IgG2a / FITC	R35-95	Pharmingen, San Jose, USA	1:100
Ratte IgG2a / PE	R35-95	Pharmingen, San Jose, USA	1:100
Ratte IgG2b / FITC	A95-1	Pharmingen, San Jose, USA	1:100
Ratte IgG2b / PE	A95-1	Pharmingen, San Jose, USA	1:100
arm. Hamster IgG / FITC		Serotec, Düsseldorf	1:100

2.4 Oligonukleotid-Primer

Alle verwendeten Primer wurden von den Firmen Carl Roth GmbH, Karlsruhe und MWG Biotech AG, Ebersberg bezogen und in der folgenden Tabelle unter Angabe der Fragmentlänge, der Anlagerungstemperatur und der Sequenz zusammengefaßt. Das Design dieser Starteroligonukleotide wurde von Markus Hildner und Michael Moos (Institut für Vaskuläre Medizin, Jena) entworfen.

Gen	Fragment- länge	Anlagerungs- temperatur	Sequenz
GAPDH	405 bp	71°C	5': GGG AAG CCC ATC ACC ATC TTC 3':GTT CTG GGC AGC CCC ACG GCC
5-LO	348 bp	69°C	5': CCG CTT CAT GCA CAT GTT CCA G 3': GCA GCC AGG AAC TGG TGT GTA C
BLT1R	258 bp	69°C	5':CCT TCT TCT CCT GGT GGC ATG TC 3':GTG GCA CAG GCG GCA ACC CAT C
CysLT1R	207 bp	63°C	5':CAG GAG CCC TGT GAA TGG AG 3':GTG GCC ACT GTT CTT ATG TTG
CysLT2R	270 bp	63°C	5': CTG AGT GTG GTG CGT TTC CTG 3': GTA GCA GAT GGT GAG CGT GAG
FLAP	351 bp	71°C	5':GGC CCT TGT CAC CCT CAT CAG CG 3':CCG GCG AAG GAC ATG AGG AAC AGG
Genotyp wild	140 bp	60°C	5': GCA GCG CAT CGC CTT CTA TC
Genotyp 5-LO-defizient	630 bp		3': GCC AAT GCC ACC GGG GGC 3': TAG AAG TAG AAG GGG ATG TCT TC

2.5 Standards, Enzyme und Reagenziensätze (KITs)

DNAse Set	Qiagen, Hilden
dNTPs	Roche-Diagnostik, Mannheim
Invisorb [®] Spin PCRapid Kit	Invitek, Berlin
Collagenase D	Roche-Diagnostik, Mannheim
Low DNA Mass Ladder	Invitrogen, Leek, NL
Platinum-Taq-Polymerase	
10 x PCR-Puffer und 50 mM MgCl ₂	Invitrogen, Leek, NL
Poly(dT)-Primer	Roche-Diagnostik, Mannheim
RNA 6000 Leiter	Ambion, Inc., Austin, TX, USA
RNA 6000 Nano Reagenzien	Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA
RNAsin	Roche-Diagnostik, Mannheim
RNeasy [®] Mini Kit (250)	Qiagen, Hilden
RT-AMV mit 5 x RT-Puffer	Roche-Diagnostik, Mannheim

2.6 Zytokine, Leukotriene und Medien

GM-CSF (rekombinant Maus)	R & D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
TGF- β (rekombinant human)	R & D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
LTB ₄ , LTD ₄	Cayman, Ann Arbor, MI, USA
RPMI-1640 Medium	Gibco [™] Invitrogen Corporation, Leek, NL

3. Methoden

3.1 Tiere

Es wurden ausschließlich weibliche Mäuse, im Alter von 8 bis 16 Wochen, für die Experimenten verwendet. Sowohl die Kontrolltiere, als auch die 5-LO defizienten Tiere (in Kooperation mit Beverly Koller [GOULET et al. 1994]) waren C57BL/6J-Inzuchtstämme und wurden unter pathogenfreien Bedingungen im Tierversuchsgebäude der Friedrich–Schiller-Universität Jena gehalten. Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden nach den Richtlinien der Ethikkommission der Friedrich–Schiller-Universität Jena durchgeführt.

3.1.1 Anästhesie

Für einige Versuche wurden die Mäuse narkotisiert.

Das Narkotikum setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

0,5 ml Domitor-R (0,5 mg/kg Medetomidin)

1,0 ml Dormicum-R (5 mg/kg Midazolam)

1,0 ml Fentanyl-R Janssen (0,05 mg/kg Fentanyl)

Die Dosierung wurde nach der Formel: Mausgewicht in kg x 7,0 individuell berechnet und intraperitoneal verabreicht. Nach Durchführung der notwendigen Eingriffe wurde den narkotisierten Mäusen ein Gegenmittel mit folgender Zusammensetzung ebenfalls intraperitoneal nach der Formel: Mausgewicht in kg x 8,5 verabreicht:

0,5 ml Antisedan-R (2,5 mg Atipamezol)

5,0 ml Anexate-R (0,5 mg Flumazenil)

0,3 ml Naloxon 0,4 mg (1,2 mg Naloxon)

3.2 Isolierung von Zellen aus lymphatischen Geweben

Zur Gewinnung von Zellen aus lymphatischen Geweben wurden folgende Gewebe verwendet: Milz, Thymus, Peyersche Plaques sowie subkutane und mesenterische Lymphknoten. Diese wurden direkt nach ihrer chirurgischen Entnahme vom umgebenden Gewebe und Fett befreit

und in einer Petrischale, in die zuvor RPMI-1640 vorgelegt worden war, in kleine Stücke geschnitten. Die zerkleinerten Proben wurden 30 Minuten bei 37°C in Collagenase D Lösung (1 mg/ml in RPMI-1640 / 10% FCS) inkubiert und anschließend zweimal mit PBS / 5% FCS / 5 mM EDTA gewaschen. Für einzelne Versuchsansätze wurde auf den Einsatz der Collagenase verzichtet, um einen Verdau der empfindlichen Oberflächenmerkmalen durch mögliche Trypsinaktivität zu vermeiden. In diesen Fällen wurden die Milzzellen mit eiskühlten PBS mit einer Kanüle aus dem Gewebe gespült, bis nur ein weißer Bindegewebesack übrig blieb. Die Lymphknoten wurden mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein 70 µm Nygonsieb gedrückt und mit PBS / 5% FCS / 5 mM EDTA gespült. Im Anschluss wurden Gewebeteile durch Filtration mit einem 35 µm Nylonfilter entfernt und die suspendierten Zellen abzentrifugiert (5 min, 400 x g). Danach wurde zweimal mit je 25 ml PBS / 5% FCS / 2 mM EDTA gewaschen und die Zellzahl mit einem Coulter Counter (Coulter Electronics Limited, Luton, UK) oder Neubauer-Kammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.3 Isolierung der Ohrepidermis

Die Ohren der getöteten Mäuse wurden nahe der Basis abgetrennt und mit 70% Ethanol zur Desinfektion besprüht. Nach der Trocknung bei Raumtemperatur für fünf Minuten erfolgte die Trennung der Ohren von der Schnittstelle her in eine dorsale und eine ventrale Seite durch zwei spitze Pinzetten. Die getrennten Hälften wurden in Petrischalen mit PBS / 2% BSA / 20 mM EDTA überschichtet und für 45 (dorsal) bzw. 60 Minuten (ventral) mit der dermalen Seite nach unten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Ohrhälften mit PBS gewaschen und die Epidermis in Haarwuchsrichtung mit einer Pinzette abgezogen.

Die Epidermis wurde dann entweder für En-Face-Präparate direkt mit dem Stratum Corneum (glänzend) nach unten auf Objektträger aufgebracht und dort für eine Stunde getrocknet oder zur Isolation einer Einzelzellsuspension weiter verarbeitet.

3.4 Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen aus Knochenmarkgewebe

Die Mäuse wurden getötet und das gesamte Fell mit 70% Sprühethanol desinfiziert. Anschließend wurde ein Bauchschnitt gesetzt, so daß das Fell vom Unterkörper über die Hinterläufe abgezogen werden konnte. Danach erfolgte die Abtrennung der Hinterläufe, wobei zu beachten war, daß die Knochen des Ober- und Unterschenkels intakt blieben. Nach der Entfernung der Pfoten proximal vom Sprunggelenk und Säuberung der Knochen von Muskel- und Sehngewebe wurden die frei präparierten Ober- und Unterschenkel für zwei Minuten in 70% Ethanol desinfiziert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter der Sicherheitswerkbank. Die Knochen wurden mit sterilem PBS gespült, die Markhöhle beidseitig geöffnet und das Knochenmark mit einer schmalen Kanüle mit sterilem PBS / 10% FCS unter leichtem Druck ausgespült.

Zur Zellvereinzelung wurde die Knochenmarksuspension wiederholt auf- und abpipettiert und mit einem 70 µm Nylonsieb gefiltert, um verbliebene Knochensplitter und Gewebereste zu entfernen. Nach einer Zentrifugation von fünf Minuten bei 1200 rpm (Raumtemperatur) und einmaligem Waschen der Knochenmarkszellen mit PBS / 10% FCS erfolgte die Zellzahlbestimmung.

3.5 Kryopräservation von Geweben

Die Organe bzw. einzelne Organteile wurden direkt nach ihrer chirurgischen Entnahme sorgfältig gesäubert, mit Tissue Tek[®] (Sakura Finetek Europe B.V. Zoeterwoude, Niederlande) luftblasenfrei überschichtet und vorsichtig in flüssigem Iso-Pentan auf Trockeneis eingefroren. Bis zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die Präparate bei –80°C aufbewahrt.

3.6 Anfertigung von Gefrierschnitten

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die Gewebeproben auf –24°C erwärmt. Anschließend wurden die Präparate auf dem Probenträger des Kryostatess (Microm GmbH, Walldorf) fixiert und Schnitte mit einer Stärke von sechs bis acht Mikrometern angefertigt.

Nach dem Aufschmelzen der Schnitte auf Objektträger (Histobond™, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen) bei Raumtemperatur wurden diese mindestens eine Stunde luftgetrocknet und anschließend bei -20°C gelagert oder sofort weiter verwendet.

3.7 Lokaler Lymphknoten Test

Um eine Migration von Langerhans-Zellen in die hautassoziierten Lymphknoten zu induzieren, wurde die Haut von Mäusen mit einem Kontaktallergen behandelt [CUMBERBATCH & KIMBER 1990]. Bei Verwendung eines Farbstoffes als Antigen ist es möglich, die Zellen, welche das Antigen aufgenommen haben und dadurch markiert sind, direkt in den involvierten Lymphorganen zu identifizieren.

Für einen optimalen Antigenkontakt wurden die Tiere zunächst narkotisiert und dann erfolgte eine Rasur von drei kreisrunden Arealen der Haut auf jeder Seite der Maus: hinter den Ohren, an der Achsel und vor den Leisten. Anschließend wurde jeweils 25 µl FITC-(Fluoreszeinisothiozyanat)-Lösung mit einer Pipette aufgebracht.

FITC-Lösung: Azeton : Dibutyl-Phthalat (Sigma) 1 : 1
 8 mg/ml FITC (Isomer 1, Sigma)

Die Lösung wurde vor jedem Experiment frisch angesetzt. Nach 18 bis 24 Stunden wurden die Mäuse durch CO₂-Begasung getötet und die subkutanen Lymphknoten für die Analysen entnommen.

3.8 Zellkultur

Die Zellkultivierung der isolierten Knochenmarkszellen erfolgte nach einem Protokoll von Lutz [LUTZ et al. 1999].

Die vereinzelt Zellen (5×10^4 Zellen / ml) wurden mit verschiedenen Konzentrationen an TGF-β im Kompletmedium (RPMI-1640 mit 10% FCS, 10 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 µg/ml Penizillin / Streptomycin und 50 µM β-Mercaptoethanol) mit 10 ng/ml GM-CSF auf Bakterialschalen (Falcon, Heidelberg) aufgeteilt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO₂.

Ansatz 1	ohne TGF- β
Ansatz 2	mit 10 ng /ml TGF- β
Ansatz 3	mit 20 ng /ml TGF- β

Während der ersten neun Tage wurde die Zellzahl im Überstand auf maximal $2,5 \times 10^5$ Zellen / ml beschränkt. Bei Überschreitung dieser Grenze wurden die überzähligen Zellen auf neue Bakterienkulturen umgesetzt. Alle zwei Tage wurde 50% des Mediums ausgetauscht. Nach der ersten Phase wurden alle nicht adhärenen Zellen von den Bakterienkulturen abgezogen und mit gleichem Zytokinzusatz auf Gewebekulturschalen umgesetzt und für weitere zwei Tage kultiviert. Die verbliebenen adhärenen Zellen der Bakterienkulturen wurden unter gleichen Bedingungen parallel weiter kultiviert. Am elften Tag der Kultivierung wurde der Mediumüberstand der Gewebekulturschalen mit den nicht adhärenen Zellen komplett abgezogen. Die isolierten Zellen wurden mit 15 ml Kompletmedium mit 10 ng/ml GM-CSF resuspendiert und für weitere zwei Tage kultiviert. Für eine Aktivierung der Zellen wurde den entsprechenden Kulturen einen Tag vor der Beendigung der Kultivierung 1 μ g/ml LPS zugefügt. Am 14. Kulturtag wurden die Zellen geerntet. Der Überstand wurde komplett abgezogen und die Zellzahl der nicht adhärenen Zellen bestimmt. Im Anschluß daran erfolgte eine Aufteilung der Zellen je nach Ausbeute für Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenz, Kalzium-Messung und RNA-Gewinnung für RT-PCR.

3.9 Kalzium-Messung

Eine Möglichkeit die LT-Rezeptoren und andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren funktionell nachzuweisen, ist die Messung der Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels nach Zugabe Rezeptor-spezifischer Agonisten durch Einsatz Ca^{2+} -sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe, da bekannt ist, daß es nach Bindung von LT an ihre Rezeptoren zur Ca^{2+} -Mobilisierung kommt.

Die wichtigsten Eigenschaften der Ca^{2+} -sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe sind: 1. die spezifische Bindung von Ca^{2+} mit einem K_d -Wert im physiologischen Bereich; 2. unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften der Indikatoren in Ca^{2+} -gebundener und -freier Form und 3. leichtes Eindringen in die Zelle.

Für die folgenden Messungen wird der Fluoreszenz-Indikator Fura-2 [GRYNKIEWICZ et al. 1985] eingesetzt. Fura-2 gehört zu den ratiometrischen Fluoreszenz-Indikatoren, dessen Fluoreszenzeigenschaften sich durch die Bindung von Kalzium verändern. Mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration kommt es zu einer Änderung im Anregungsspektrum. Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei Anregung mit 340 nm und einem Abfall bei Anregung mit 380 nm und umgekehrt. Der Vorteil dieser ratiometrischen Messung liegt darin, daß das Fluoreszenzsignal unabhängig von Größen wie z.B. der Farbstoffkonzentration, Zellzahl und der Dicke der Zelle ist.

Für diese Messung wurden 5×10^5 aus Knochenmark differenzierte DZ in 500 μl RPMI-1640 Medium mit 4 μM Fura-2 für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit Kalziummesspuffer (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 10 mM Natrium-HEPES, 10 mM Glukose, 1,5 mM CaCl_2 , 0,25% BSA, pH=7,4) gewaschen. Im Anschluß daran erfolgt die Überführung der Zellen in 1,4 ml Kalziummesspuffer in die vorgewärmten Küvetten mit Magnetührer. Nach einer Äquilibrierungsphase von ca. 200 Sekunden erfolgte die Zugabe von LTD_4 bzw. LTB_4 (Endkonzentration 100 nM). Nach weiteren 200 Sekunden wurden die Zellen durch die Zugabe von Triton-X-100 (Endkonzentration 0,5%) permeabilisiert und der Maximalwert definiert. Nach weiteren 200 Sekunden wurde Kalzium durch die Zugabe von 100 mM $\text{Na}_4\text{-EGTA}$ (1,902 g EGTA, 20 ml 1 M NaOH, ad 50 ml Aqua dest., Endkonzentration 4 mM) gebunden und der Minimalwert bestimmt.

3.10 Anfertigung von Zytospins

Zur Herstellung von Zytospins wurden 100 μl einer Einzelzellsuspension (1×10^6 Zellen/ml in PBS / 10% FCS) mit Hilfe einer Zytocentrifuge (Shandon™, England) für drei Minuten bei 300 U/min auf Objektträger zentrifugiert. Danach wurden die Zellen getrocknet (1 Stunde, Raumtemperatur) und dann direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

3.11 RNA-Gewinnung aus Zellen und Geweben

Zellen im Überstand aus Zellkulturen wurden geerntet, 10 Minuten bei 400 x g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend erfolgte die Resuspendierung der Zellen in 900 µl Trizol® (Gibco, Eggenstein).

Bei adhärennten Zellen aus Zellkulturen wurde zunächst der Überstand sorgfältig abgenommen und die Petrischale mit PBS gewaschen. Danach erfolgten die Überschichtung der Schale mit 900 µl Trizol und das Abschaben der Zellen mit einem Silikonschaber (Nunc™, Wiesbaden). Die gewonnene Suspension wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Für die RNA-Gewinnung aus Geweben wurden entweder Gefrierschnitte mit einer Dicke von 100 µm oder maximal 1×10^6 Zellen nach der Zellvereinzelung in PLG-Reaktionsgefäße (Phase Lock Gel) aufgenommen, mit 900 µl Trizol überschichtet und wenn nötig, noch mit einem Dispergierwerkzeug (Omni-Tip, Süd-Laborbedarf, Gauting) homogenisiert. Nach der Aufnahme des Materials in Trizol erfolgte nach Zugabe von 180 µl Chloroform eine Phasenvermischung durch kräftiges Schütteln. Nach einer Inkubation von fünf Minuten bei Raumtemperatur und erneutem Schütteln wurden die Proben für 15 Minuten bei 12°C und maximaler Drehzahl (Biofuge 15R, Heraeus Sepatech, Hanau) zentrifugiert. Nach der Phasentrennung wurde die obere Phase vollständig in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 280 µl Ethanol zugegeben. Dieses Gemisch wurde auf eine RNeasy-Säule (Qiagen, Hilden) überführt und nach Angaben des Herstellers weiter bearbeitet. Die RNA wurde mit zweimal 25 µl DEPC-Wasser (500 µl Diethyl-Pyrocacbonat in 500 ml Aqua dest., Roth, Karlsruhe) eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.12 Qualitätsbestimmung der RNA

Die hohe Sensitivität heutiger molekularbiologischer Methoden erforderte auch eine erhöhte Qualität der Ausgangsmaterialien, da bereits kleine Qualitätsunterschiede, z.B. beginnende Degeneration der RNA, zu großen Schwankungsbreiten in den Ergebnissen führt und vergleichende Analysen nicht mehr zulassen. Zur Qualitätsbeurteilung wurde deshalb die Integrität der isolierten RNA bestimmt. Dies geschah mit Hilfe einer Kapillarelektrophorese mit Fluoreszenzdetektion auf einem RNA Nano Chip (Agilent Technologies, Palo Alto, CA,

USA). Die bildliche Darstellung erfolgte computergestützt als Elektropherogramm mit zwei Fluoreszenzmaxima im Bereich der 18S und 28S RNA. Das Verhältnis dieser beiden muß bei qualitativ hochwertiger RNA einen Wert größer als 1,5 ergeben. Die Methode wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.13 DNA-Gewinnung aus Mausschwänzen

Um bestimmte Gene in einem Modellorganismus auszuschalten, besteht die Einbaumöglichkeit eines Resistenzgens, z.B. neoR, in das auszuschaltende Gen. Nach Einbau dieser Fremd-DNA in Vorkeime und Züchtung von homologen Nachkommen für diesen Gendefekt kann durch RT-PCR Analysen der genetische Status verifiziert werden. Zur Überprüfung der 5-LO-defizienten Mäuse wurden DNA Proben aus Schwanz-Biopsien untersucht.

Zur Isolation der DNA wurden von C57BL/6J- und C57BL/6xLO5-/-Tieren je zwei Millimeter der Schwanzspitze abgetrennt und in 200 µl PNBD-Puffer (50 mM KCL, 10 mM Tris-HCL, pH 8,3, 2,5 mM MgCL₂, 0,01% Gelantine, 2,22% NP 40, 2,22% Tween 20) unter Zugabe 3 µl Proteinase K Lösung (10 mg/ml) für zwei Stunden bei 55°C unter Schütteln inkubiert. Danach erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K durch zehnminütiges Erhitzen auf 95°C. Nach Zugabe von 200µl DEPC-Wasser wurde die gewonnene Suspension zur Entfernung der Festbestandteile fünf Minuten bei 400 x g zentrifugiert und von dem Überstand 2 µl in die PCR eingesetzt.

3.14 Reverse Transkription, PCR und Real-Time PCR

Für den Einsatz in der PCR müssen mRNA-Proben zunächst enzymatisch mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Von der gewonnen mRNA aus Gewebeproben oder Zellsuspensionen wurden beispielsweise für einen 50 µl-Ansatz je 1,8 µg Gesamt-RNA in 30 µl DEPC-Wasser für zehn Minuten mit 8 µl PolydT-Primer (25 pmol/µl) bei 72°C inkubiert. Die PolydT-Primer dienen als Erkennungssequenz für die reverse Transkriptase. Anschließend wurde auf 42°C abgekühlt, 22 µl RT-Mix (167 µM dNTPs, 0,7 U/µl RNase Inhibitor, 0,1 µg/µl BSA, 0,35 U/µl AMV Reverse Transkriptase in einfach RT-

Puffer) zugegeben und 60 min inkubiert. Zum Abschluß erfolgte die Denaturierung der mRNA-cDNA Hybride bei 94°C für zehn Minuten.

Bis zur weiteren Verwendung wurden die cDNA-Lösungen bei -20°C aufbewahrt.

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient zur künstlichen Vervielfältigung bestimmter DNA-Sequenzen. Dafür wurden spezifische Starteroligonukleotide (Primer, siehe Tabelle unter 2.4), ausgewählt, die das interessierende Genfragment einrahmen. In Abhängigkeit von Basengehalt, Fragmentlänge und Transkriptmenge wurde die cDNA-Sequenz dann unter definierten Reaktionsbedingungen in einem Thermocycler, enzymatisch mit Hilfe von hitzebeständigen Polymerasen amplifiziert. Im Anschluß an die PCR erfolgt die Auswertung über eine Elektrophorese mit Agarosegelen.

Der Vorteil der Real-Time PCR gegenüber der herkömmlichen PCR besteht darin, dass bei der Real Time PCR nach jedem Zyklus die Menge an gebildeter DNA direkt gemessen werden kann. Bei der herkömmlichen PCR ist lediglich eine Abschätzung oder semiquantitative Aussage möglich, wenn die bestimmten Transkriptmengen für ein Haushaltsgen normalisiert werden.

Bei der Real Time PCR wurde der DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen[®] verwendet. Durch die Messung der Strahlungsintensität des Farbstoffes nach Anregung konnte die Menge der gebildeten Transkripte über den Vergleich mit einer gleichzeitig amplifizierten Eichreihe computerunterstützt absolut berechnet werden.

Um auszuschließen, dass unspezifische Reaktionsprodukte und Primerdimere die Fluoreszenzwerte verfälschen, wurde nach Reaktionsablauf eine Schmelzkurve erzeugt. Da Schmelzkurven doppelsträngiger DNA-Proben jeweils spezifische Kinetiken aufweisen, können unspezifische PCR-Produkte an Hand der abweichenden Kinetiken nachgewiesen werden.

Bei der Auswahl der einzelnen Primer wurde darauf geachtet, daß sie Exon-Intron Grenzen der ausgewählten Gene überspannten. Dadurch konnte eine Amplifikation von enthaltener genomischer DNA ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurde ein DNase Verdau während der RNA Aufbereitung durchgeführt.

Für die Eichreihen der Real-Time PCR wurden Standardfragmente benötigt, welche aus PCR-Produkten mit Hilfe des Invitak PCR Kit[®] nach Angaben des Herstellers aufgereinigt wurden.

Real-Time PCR-Ansatz	0,2 mM	je dNTP
	1,8 mM	MgCl ₂
	0,2 µM	je Primer
	1,5 U	Platinum [®] Taq DNA Polymerase
	0,1 µg/µl	BSA
	1:50	SybrGreen [®]
	in einfach PCR-Puffer (ohne MgCl ₂)	

Von diesem Ansatz wurden je 23 µl mit 2 µl cDNA (30 ng/ µl) versetzt.

3.15 Gelelektrophorese

DNA-Moleküle unterschiedlicher Länge können aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität in Gelen getrennt werden. Man macht sich dabei die negative Gesamtladung der DNA-Doppelhelix zunutze.

Zum Auftrennen von DNA wurden 2%ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1xTAE-Puffer aufgekocht und nach dem Abkühlen auf etwa 50 °C wurde Ethidiumbromid hinzu gegeben (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Als Laufpuffer dient 1x TAE-Puffer. PCR-Proben wurden mit 10% Stopplösung (48% Glycerin, 0,1 M EDTA, pH 8,0, 0,1% SDS, 0,05% Bromphenolblau) und dann jeweils 10 µl in die Taschen des Gels pipettiert. Als Größenstandard wurde eine Probe mit Fragmenten bekannter Länge und Konzentrationen mitgeführt, mit dem auch eine grobe Quantifizierung der DNA-Menge pro Bande möglich war. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 140 Volt für 20 Minuten. Durch das in die DNA interskalierte Ethidiumbromid fluoreszierten die Fragmente im UV-Licht orange und konnten somit dokumentiert werden.

3.15.1 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

In Agarosegel aufgetrennte DNA wurde mit Hilfe des Invisorb Spin PCRapid Kit (Invitack GmbH, Berlin) aus dem Gel eluiert und zur Herstellung von Standardfragmenten für die Real-Time-PCR eingesetzt. DNA-Fragmente können bei dieser Methode unter Hochsalz-Bedingungen an eine Matrix gebunden und unter Niedrigsalz-Bedingungen (Wasser oder TE-

Puffer) wieder eluiert werden. Bei der Isolation wurde die relevante Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 300 µl Aqua dest. überführt. Im Anschluss daran wurde das Protokoll nach Angaben des Herstellers befolgt.

3.16 Durchflusszytometrie

Die hier verwendete Durchflusszytometrie dient, ähnlich der indirekten Immunfluoreszenz, zur Charakterisierung einzelner Zellen über fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper. Die Betrachtung einer einzelnen Zelle wird durch das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung ermöglicht, bei der die Zellen einzeln einen Laserstrahl passieren. Die dadurch verursachte Beugung und Streuung des Laserstrahls wird gemessen und ermöglicht eine Aussage über Größe und Granularität einer Zelle. Durch die Markierung der Zellen mit fluorochrom-gekoppelten Antikörpern (siehe Tabelle unter 2.3.1) sind neben diesen allgemeinen Aussagen auch spezifische Aussagen über das Vorhandensein von bestimmten Oberflächenmerkmalen oder intrazellulären Bestandteilen der einzelnen Zellen möglich. Die Betrachtung dieser Merkmale erfolgt über die Messung der Lichtemission der Fluoreszenzfarbstoffe in definierten Wellenlängenbereichen nach Anregung durch den Laserstrahl. Die gemessenen Ereignisse werden durch Detektoren aufgezeichnet, computergestützt verrechnet und in Diagrammen dargestellt. Für die Analysen wurde ein FACS-Calibur (Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Belgien) verwendet, das mit einem Argon-Laser (Anregungswellenlänge 488 nm) und Detektoren für FSC (Vorwärtsstreulicht), SSC (Seitwärtsstreulicht), FL1 (530/30 nm), FL2 (585/42 nm) und FL3 (670 nm/LP) ausgestattet war.

Für die Durchflusszytometrischen Analysen wurden Einzelzellsuspensionen aus isolierten Geweben oder kultivierte Zellen zuerst mit anti-CD16/CD32 (1µg/10⁶ Zellen) in PBS / 2% FCS für zehn Minuten bei 4°C vorinkubiert, um unspezifische Bindungen an FC-γ-Rezeptoren zu unterdrücken und nach einem Waschschrift mit Zentrifugation bei 400 x g mit direkt markierten Antikörpern entsprechender Verdünnung in PBS / 2% FCS für 45 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben mit PBS / 2% FCS gewaschen für zehn Minuten bei 400 x g zentrifugiert und am Ende in 300 µl PBS aufgenommen.

Während der Nachweis von Oberflächenmerkmalen immer mit lebenden Zellen durchgeführt wurde, erforderte die intrazelluläre Messung eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen. Dafür wurden die Zellen zunächst für zehn Minuten mit PBS / 4% PFA fixiert, dann bei 600 x g zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluß daran erfolgte die Permeabilisierung der Zellen durch Saponinpuffer (0,5% Saponin, 1% BSA, 0,05% Natriumazid). Gleichzeitig erfolgte die Inkubation mit den direkt markierten Antikörpern gegen die intrazellulären Bestandteile, für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proben zweimal mit Saponinpuffer gewaschen, und abschließend in 300 µl PBS zur Messung aufgenommen.

Bei der Verwendung nicht direkt markierter Antikörper, wurde der primäre Antikörper durch fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper (siehe Tabelle unter 2.3.2) nachgewiesen.

Zu jeder Analyse am Durchflusszytometer gehörte auch die Optimierung der Messparameter. Durch das Mitführen von unmarkierten Zellen werden die Autofluoreszenz und die Größenverhältnisse der einzelnen Zellen gemessen und durch einfach markierte Zellen wird die Kompensation der spektralen Überlappung der einzelnen Fluorochrome eingestellt. Zur Bestimmung von unspezifischen Antikörperbindungen wurden Isotypkontrollen (siehe Tabelle unter 2.3.3) verwendet.

Bei der Verwendung von sekundären Antikörpern bei Mehrfachmarkierungen wurde darauf geachtet, daß diese aus verschiedenen Spezies stammen, um Kreuzreaktionen zu vermeiden.

3.17 Indirekte Immunfluoreszenz

Einzelne Zellen in komplexen Geweben können über spezifisch exprimierte Oberflächenmerkmale charakterisiert werden. Dafür wurden mono- bzw. polyklonale primäre Antikörper eingesetzt (siehe Tabellen unter 2.3.1 und 2.3.2), welche durch die Verwendung von sekundären Antikörpern mit gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen wurden. Diese Farbstoffe wurden mit Licht definierter Wellenlänge angeregt und die emittierte Strahlung über Filtersysteme von einander getrennt und computerunterstützt einer bestimmten Farbe zugeordnet. Ein Vorteil der indirekten Immunfluoreszenz ist die Signalverstärkung, welche durch die Bindung mehrerer sekundärer Antikörper an den primären Antikörper ermöglicht wird. Die Verwendung von primären und sekundären Antikörpern erhöht jedoch

auch die Gefahr unspezifischer Bindungen, welche durch entsprechende Kontrollen nachgewiesen werden können.

Die Fixierung der Gefrierschnitte, Zytospins und En-Face-Präparate erfolgte mit 100%-Azeton für zehn Minuten bei 4°C. Für den Fall, daß sich mehrere Objekte auf einem Objektträger befanden, wurden die Einzelpräparate nach der Fixierung mit einem Fettstift (Pap-Pen, Immunotech, Hamburg) umrandet und so gegeneinander abgegrenzt.

Im Anschluß daran erfolgte die Rehydrierung der Präparate für 20 Minuten bei Raumtemperatur und gleichzeitig die Blockierung unspezifischer Bindungvalenzen durch Überschichtung mit Blockpuffer (2% BSA in PBS). Bei diesem Schritt wurden auch verbliebene Tissue Tek[®] Reste der Gefrierschnitte abgelöst.

Anschließend wurde die Lösung entfernt und durch die primären Antikörper ersetzt und für 45 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Präparate zweimal für 5 min in PBS gewaschen. Nach der Entfernung des PBS erfolgte die 45minütige Inkubation mit den sekundären Antikörpern in der feuchten Kammer im Dunkeln. Zu den sekundären Antikörpern wurde außerdem der DNA-Farbstoff DAPI (0,1 µg/ml) gegeben, um die Zellkerne darstellen zu können. Nach zweimaligem Waschen der Objektträger und eventueller Entfernung der Fettstiftspuren mit Waschbenzin erfolgte die Einbettung der Präparate mit Permafluor. Die fertigen Objektträger wurden bis zur Auswertung mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop bei 4°C im Dunkeln gelagert.

3.18 Konfokale Laserscanningmikroskopie

Bei der konfokalen Laserscanningmikroskopie regt ein Laserstrahl mit einer definierten Wellenlänge nur bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe an, so daß Überlappungen von verschiedenen Fluorochromen vermieden werden können. Da der Laser nur in einer bestimmten Schichtebene des Präparates die Fluorochrome der Antikörper anregt und das Streulicht ober und unterhalb dieser Ebene nicht aufgenommen wird, kann eine exakte Kolokalisation nachgewiesen werden. Dadurch besteht auch die Möglichkeit auch sehr dicke Gewebe, wie z.B. En-Face-Präparate in 0,1 µm Schritten zu analysieren oder zu einem komplexen dreidimensionalen Bild zusammenzufügen. Die Anregungswellenlängen können auch über Filter von einander getrennt werden. Durch die Verwendung von Farbfiltern und

Antikörpern mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen wurde die Darstellung von mehreren Strukturen im selben Präparat ermöglicht. Dabei wurden von jedem Fluorochrom Einzelbilder erstellt und diese dann computergestützt übereinander gelagert.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Expression der 5-LO in DZ der Maus

Im Humansystem exprimieren alle bisher untersuchten DZ 5-LO (LZ und DZ der peripheren Lymphknoten) und viele Untersuchungen zeigten, dass die 5-LO sowohl Immunreaktionen der angeborenen wie auch der erworbenen Immunität beeinflusst. Da die molekularen Mechanismen und die LT produzierenden Zellen unbekannt sind, wurde ein Modellsystem gesucht, mit dem diese Aspekte untersucht werden können. Besonders berücksichtigt werden muss dabei die Tatsache, dass DZ als Schaltstelle zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität fungieren und deshalb für die beobachteten Effekte verantwortlich sein könnten. Da funktionelle Untersuchungen humaner DZ *in vivo* nur unter großen Aufwand möglich sind, wurden für diese Arbeit 5-LO defiziente Mäuse als Modellsystem eingesetzt. Zuerst sollte geklärt werden, ob und welche DZ oder DZ-Subpopulationen in der Maus 5-LO exprimieren.

Deshalb wurde zunächst versucht, die 5-LO in den einzelnen Subpopulationen von DZ in verschiedenen nicht-lymphatischen und lymphatischen Geweben von C57BL/6J-Mäusen (B6) nachzuweisen. Um dieses zu erreichen, wurden indirekte Immunfluoreszenzanalysen mit Hilfe eines konfokalen Laserscanningmikroskops angewendet. Zum Nachweis 5-LO exprimierender DZ wurden DZ-spezifische Antiseren gegen Oberflächenmoleküle (CD11c, MHC-II usw.) und ein polyklonales Antiserum gegen 5-LO in En-Face-Präparaten und Gefrierschnitten eingesetzt. Zur Kontrolle der Spezifität des verwendeten 5-LO-Antiserums wurde der 5-LO-defiziente C57BL/6Alox5^{-/-} Mausstamm (B6Alox5^{-/-}) verwendet.

4.1.1 Identifikation 5-LO exprimierender Zellen der Haut

Zum Nachweis von LZ wurde die Epidermis isoliert (siehe 3.3) und mit Antiseren gegen CD11c, MHC-II und Langerin inkubiert. In der Maus exprimieren alle DZ der peripheren Gewebe CD11c und MHC-II und können daher durch Einsatz dieser Antikörperkombination nachgewiesen werden. Epidermale LZ können durch den LZ-spezifischen Antikörper Langerin (siehe 1.2.3) nachgewiesen werden [VALLADEAU et al. 2002].

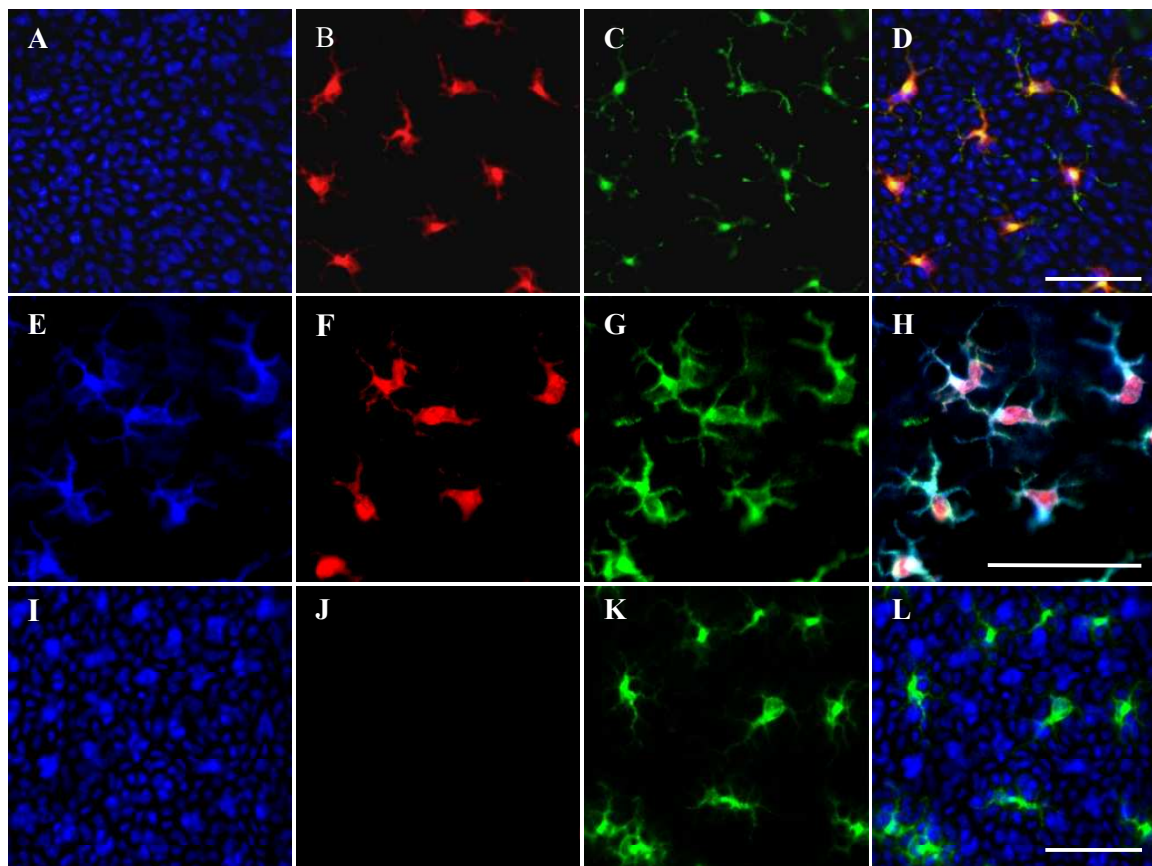


Abbildung 4: Nachweis von 5-LO positiven Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen von En-face-Präparaten der Ohrepi­dermis von B6-Tieren (A bis H) und Kontrolle der Spezifität der Bindung des 5-LO Antiserums in der Ohrepi­dermis von B6Alox5^{-/-} Tieren (I bis L)
 (A) DAPI, blau; (B) MHC-II, rot (C) Langerin, grün;
 (D) Überlagerung von A bis C
 (E) MHC-II, blau; (F) 5-LO, rot; (G) CD11c, grün; (H) Überlagerung von E bis G
 (I) DAPI, blau; (J) 5-LO, rot; (K) MHC-II, grün; (L) Überlagerung von I bis K
 Balken = 50 µm

Die Immunfluoreszenzanalysen der En-Face-Präparate zeigten eine gleichmäßige Verteilung der Langerin / MHC-II und CD11c / MHC-II positiven LZ der Epidermis (Abb. 4, A bis D). Durch eine Dreifachmarkierung mit Antikörpern gegen CD11c, MHC-II und 5-LO konnte gezeigt werden, dass alle 5-LO positiven Zellen mit CD11c und MHC-II positiven Zellstrukturen assoziiert waren. (Abb. 4, E bis H). Kontrolluntersuchungen von 5-LO defizienten Tieren dokumentieren die Spezifität des eingesetzten 5-LO Antiserums (Abb. 4, I bis L). Die Immunfluoreszenzanalysen zeigten keine offensichtlichen Unterschiede in der Verteilung und Morphologie der epidermalen LZ der beiden Mausstämme (siehe auch 4.3). Eine weitere hämatopoetische Zellpopulation der Epidermis, die CD3ε positiven epidermalen

T-Zellen, zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster wie die LZ (Abb. 5) exprimieren aber, ebenso wie die Keratinozyten, die in engem Kontakt mit den Dendriten der LZ stehen, keine 5-LO. Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass LZ der Epidermis, wie humanen LZ, die einzige 5-LO exprimierende Zellpopulation der Epidermis ist.

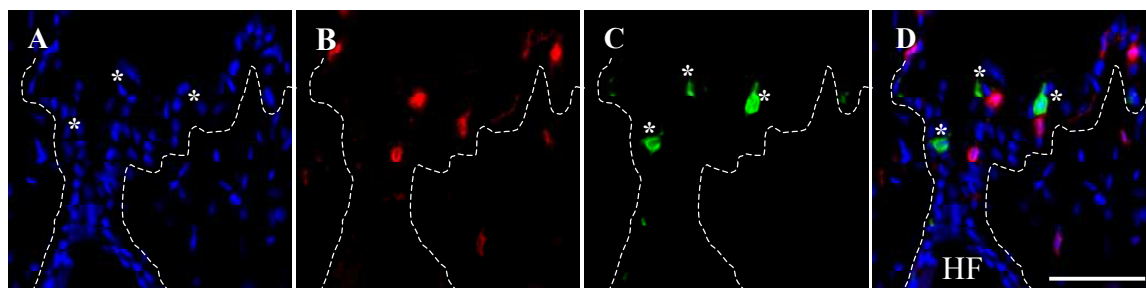


Abbildung 5: Darstellung von epidermalen T-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen der Bauchhaut eines B6-Tieres
 (A) DAPI, blau; (B) 5-LO, rot; (C) CD3ε, grün; (D) Überlagerung von A bis C
 Die gestrichelte Linie verdeutlicht die Grenze zwischen Epidermis und Dermis.
 HF – Haarfollikel; Stern – epidermale T-Zelle
 Balken = 50 µm

Durch den Einsatz von Gefrierschnittpräparaten wurde deutlich, dass die 5-LO Expression nicht auf LZ der Epidermis beschränkt war. Auch in der Dermis konnten 5-LO exprimierende Zellen nachgewiesen werden (Abb. 6). Die Identifikation dermalen DZ wird durch die Tatsache erschwert, dass DZ-spezifische Oberflächenmarker z.B. MHC-II unter bestimmten Umständen auch von Makrophagen Subpopulationen exprimiert werden [DUPASQUIER et al. 2004]. Durch den Einsatz von MHC-II spezifischen Antikörpern konnten zunächst zwei Populationen MHC-II positiver dermalen Zellen identifiziert werden, die sich hinsichtlich der 5-LO Expression voneinander unterscheiden (Abb. 6, A bis D). Alle 5-LO positive Zellen exprimieren gleichzeitig auch MHC-II, aber nicht alle MHC-II positive Zellen 5-LO.

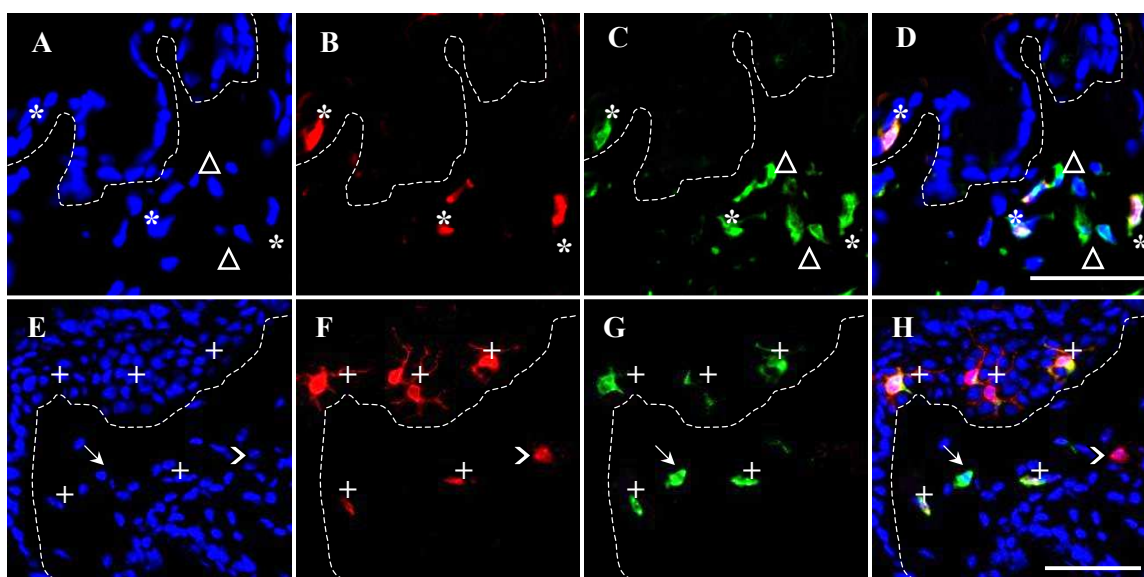


Abbildung 6: Identifizierung von 5-LO exprimierenden dermalen Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen der Bauchhaut eines B6-Tieres
 (A) DAPI, blau; (B) 5-LO, rot; (C) MHC-II, grün; (D) Überlagerung von A bis C
 (E) DAPI, blau; (F) 5-LO, rot; (G) CD11c, grün; (H) Überlagerung von E bis G
 Die Grenze zwischen Epidermis und Dermis ist durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet.
 Stern: 5-LO / MHC-II positive Zelle;
 Pfeilkopf: 5-LO negative / MHC-II positive Zelle;
 Kreuz: 5-LO / CD11c positive DZ;
 Pfeil: 5-LO negative / CD11c positive DZ;
 Pfeilkopf: 5-LO positive / CD11c negative Zellen
 Balken = 50 μ m

Bei diesen Zellen kann es sich sowohl um dermale DZ, ausgewanderte LZ als auch um Subpopulationen von Makrophagen handeln. Eine kürzlich veröffentlichte Untersuchung [DUPASQUIER et al. 2004] zeigte, dass Makrophagen in der nicht pathologisch-veränderten Dermis kein CD11c exprimieren. Aus diesem Grund wurde CD11c in die Untersuchung einbezogen (Abb. 6, E bis H). Auch die CD11c positiven DZ unterscheiden sich hinsichtlich ihrer 5-LO Expression. In der Dermis kommen CD11c / 5-LO positive DZ vor, bei denen es sich wahrscheinlich um ausgewanderte LZ handelt. Die anderen CD11c positiven DZ exprimieren keine 5-LO und könnten die dermalen DZ repräsentieren. Bei den 5-LO positiven und CD11c negativen Zellen handelt es sich wahrscheinlich um Makrophagen (Abb. 6, E bis H).

Diese Analysen deuten darauf hin, dass eine Subpopulation von Makrophagen und eine Subpopulation von DZ 5-LO exprimieren. Da LZ in der Epidermis 5-LO exprimieren, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der 5-LO positiven DZ Subpopulation um ausgewanderte LZ handelt und nicht um eine Subpopulation dermalen DZ.

Dieses Ergebnis deutet ebenfalls darauf hin, dass die LZ auch nach ihrem Austritt aus der Epidermis noch 5-LO exprimieren. Um diesen Befund zu verifizieren wurden nachfolgend DZ anderer peripherer Gewebe untersucht.

4.1.2 Identifikation 5-LO positiver Zellen der Trachea und der Lunge

Nach den ersten Beobachtungen in der Haut wurde die Mukosa der Atemwege auf die 5-LO-Expression in DZ untersucht.

Beide Epithelien stellen ein Abschlussgewebe der äußeren Körperhülle dar und dienen dazu den Körper vor eindringenden Mikroorganismen zu schützen. Sie unterscheiden sich jedoch im Aufbau, die äußere Schicht der Haut verhornt und wird regelmäßig nach Abstoßung erneuert, während die äußere Schicht der Schleimhaut ein Flimmerepithel darstellt.

Untersuchungen der Schleimhaut der Trachea zeigten, dass unmittelbar unter der Epithelzellschicht vorkommende CD11c positive DZ 5-LO negativ sind (Abb. 7, A bis D).

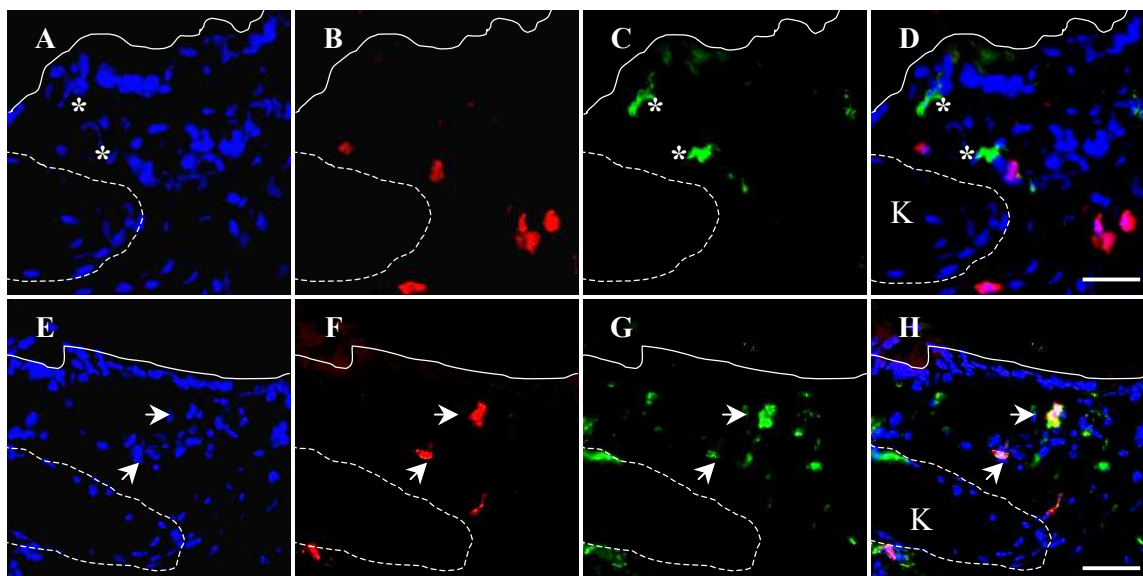


Abbildung 7: Identifizierung von 5-LO exprimierenden Zellen der Trachea eines B6-Tieres durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen
 (A) DAPI, blau; (B) 5-LO, rot; (C) CD11c, grün; (D) Überlagerung von A bis C
 (E) DAPI, blau; (F) 5-LO, rot; (G) CD68, grün; (H) Überlagerung von E bis G
 Die gestrichelte Linie gekennzeichnet die Grenze einer Knorpelspange (K) und die durchgezogene Linie grenzt die Trachea zum Lumen hin ab.
 Stern: 5-LO negative / CD11c positive DZ;
 Pfeil: 5-LO / CD68 positiver Makrophage;
 Balken = 20 µm

Durch den Einsatz des Makrophagenmarkers CD68 konnten die Makrophagen in der Mukosa der Atemwege näher charakterisiert werden. Die 5-LO exprimierenden Zellen, die in den tiefer liegenden Bindegewebe zwischen den Knorpelspangen dargestellt wurden, konnten als 5-LO / CD68 positive und CD11c negative Lungenmakrophagen identifiziert werden (Abb. 7, E bis H).

In der Mukosa der Atemwege konnte nachgewiesen werden, dass die DZ bezüglich der 5-LO Expression den dermalen DZ der Haut entsprechen und dass auch eine Subpopulation von Makrophagen der Trachea 5-LO exprimieren.

Neben der Trachea wird auch das Verdauungssystem von einer Schleimhaut ausgekleidet, die DZ enthält. Im Folgenden sollen diese Zellen näher charakterisiert werden.

4.1.3 Untersuchung der 5-LO Expression im Darm

Neben der Haut und der respiratorischen Mukosa der Atemwege bildet auch die Schleimhaut des Darmes eine Barriere gegen exogene Krankheitserreger und Antigene.

Die DZ in der gastrointestinalen Mukosa und der darin eingebetteten Peyerschen Plaques (Abb. 8, A), eine Ansammlung von Lymphfollikeln, können durch Markierung mit MHC-II und CD11c nachgewiesen werden. Durch den Einsatz des 5-LO Antiserums in Kombination mit Antikörpern gegen MHC-II oder CD11c konnte gezeigt werden, dass weder DZ der Peyerschen Plaques noch der Mukosa 5-LO exprimieren (Abb. 8).

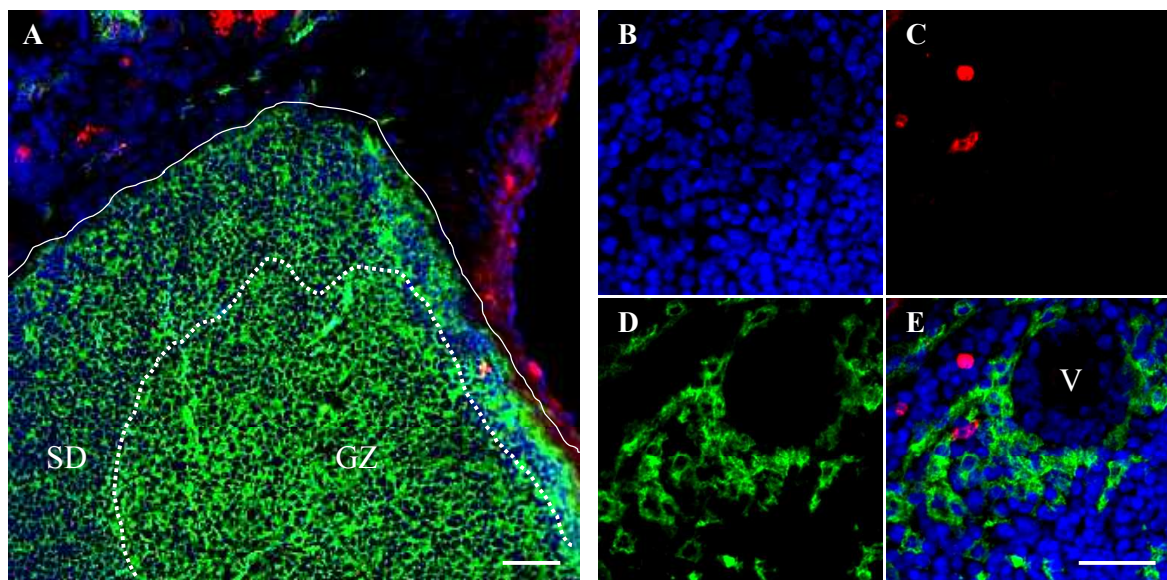


Abbildung 8: Nachweis von 5-LO positiven Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen in der Darmschleimhaut mit Peyerschen Plaques eines B6-Tieres

(A) MHC-II, grün; 5-LO, rot; DAPI, blau; Balken = 50 µm

Die durchgehende Linie kennzeichnet die Grenze des Lymphfollikels zur Mukosa des Darmes und die gestrichelte Linie verdeutlicht den Übergang zwischen der subepithelialen Domregion (SD) und einem germinalen Zentrum (GZ).

(B) DAPI, blau; (C) 5-LO, rot; (D) CD11c, grün; (E) Überlagerung von B bis D

V – Villi (Darmzotte); Balken = 20 µm

5-LO-positive Zellen in der Lamina propria konnten durch Einsatz Makrophagen-spezifischer Markerantigene als F4/80 / MOMA-1 positive Makrophagen identifiziert werden (Abb. 9).

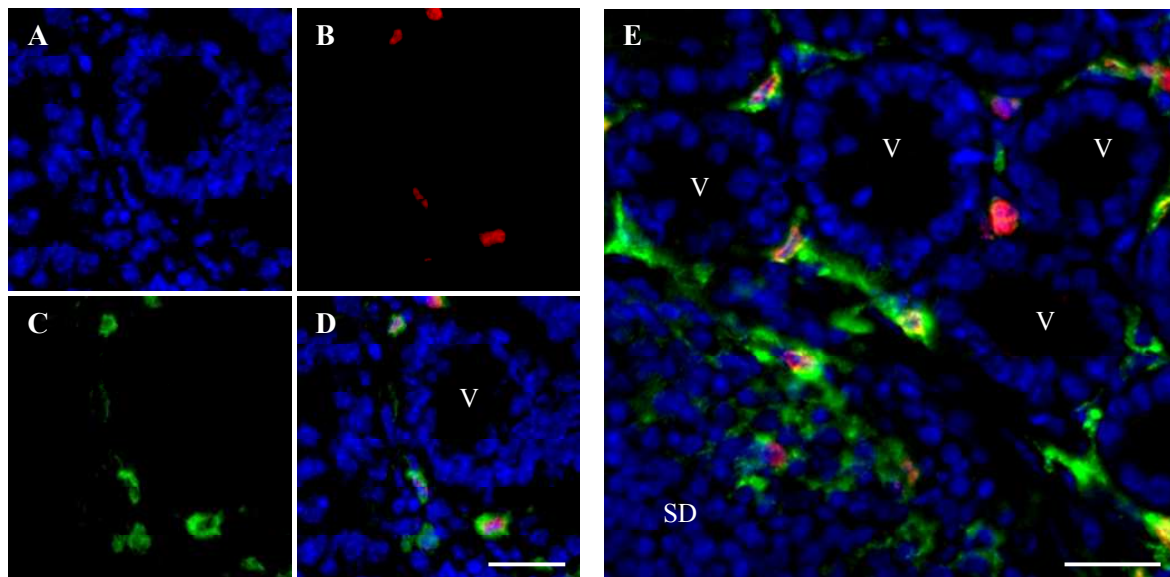


Abbildung 9: Charakterisierung der Makrophagen durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen der Darmschleimhaut mit Peyerschen Plaques eines B6-Tieres
 (A) DAPI, blau; (B) 5-LO, rot; (C) F4/80, grün; (D) Überlagerung von A bis C
 (E) MOMA-1, grün; 5-LO, rot; DAPI, blau
 V – Villi (Darmzotte); Balken = 20 µm

Die DZ der Darmschleimhaut entsprechen hinsichtlich ihrer 5-LO Expression ebenfalls den dermalen DZ. Direkt in die Mukosa eingebettet befinden sich die Peyerschen Plaques. Auch die hier vorkommenden DZ exprimieren keine 5-LO. Es kann also davon ausgegangen werden, dass in 5-LO negativen DZ, die aus der Mukosa in die Peyerschen Plaques einwandern die 5-LO nicht induziert wird. Bei den 5-LO exprimierenden Zellen in der Mukosa handelt es sich um Makrophagen.

Alle bisher untersuchten Subpopulationen von DZ der Peripherie mit Ausnahme der LZ und einer Subpopulation dermalen DZ sind 5-LO negativ. Auch die DZ im lymphatischen Gewebe des Darms reihen sich hier ein. Im Folgenden soll nun untersucht werden, ob die 5-LO in den verschiedenen DZ Populationen anderer sekundärer lymphatischer Organe exprimiert wird.

4.1.4 Identifikation 5-LO positiver Zellen der Lymphknoten und Milz

Zu den sekundären Lymphorganen zählen neben den Peyerschen Plaques auch die Lymphknoten und die Milz. Während die DZ in der Peripherie Antigene aufnehmen, haben die DZ der Lymphorgane auch noch andere Aufgaben: Die direkte Präsentation peripherer

Antigene; die Übernahme von Antigenen anderer DZ und Phagozytose von apoptotischen DZ nach Antigenpräsentation sowie die Aktivierung von T-Zellen durch Präsentation der durch die Lymphorgane gefilterten Antigene und damit die Initiation einer spezifischen Immunantwort. Durch die Identifikation von 5-LO positiven DZ könnten möglicherweise Rückschlüsse auf eine Funktion der 5-LO gezogen werden.

Da gezeigt werden konnte, dass LZ 5-LO positiv sind und andere DZ der Peripherie nicht, war es von Interesse, DZ der Lymphknoten zu untersuchen, da DZ im Laufe ihres Lebenszyklus in die nächstgelegenen Lymphknoten einwandern und dort Selbst- oder Fremdantigene präsentieren (siehe auch 1.2.1). In den Lymphknoten finden Immunreaktionen statt und es war von Interesse, herauszufinden, ob, wo und wie die 5-LO diese Reaktionen beeinflussen kann. Da bisher nur LZ als 5-LO positive DZ identifiziert werden konnten, liegt die Vermutung nahe, dass auch nur LZ der peripheren Lymphknoten 5-LO exprimieren.

Die Lymphknoten werden nach mesenterisch und subkutan oder peripher unterschieden. Dabei stehen die mesenterischen mit den inneren Organen wie Darm, Leber und Nieren in Verbindung, wobei Antigene aus dem Darm über die M-Zellen der Mukosa und die Peyerschen Plaques in die Lymphknoten geleitet werden.

In den mesenterischen Lymphknoten konnten vereinzelt vorkommende 5-LO positive Zellen nachgewiesen werden (Abb. 10). Diese Zellen konnten jedoch nicht mit DZ spezifischen AK angefärbt werden.

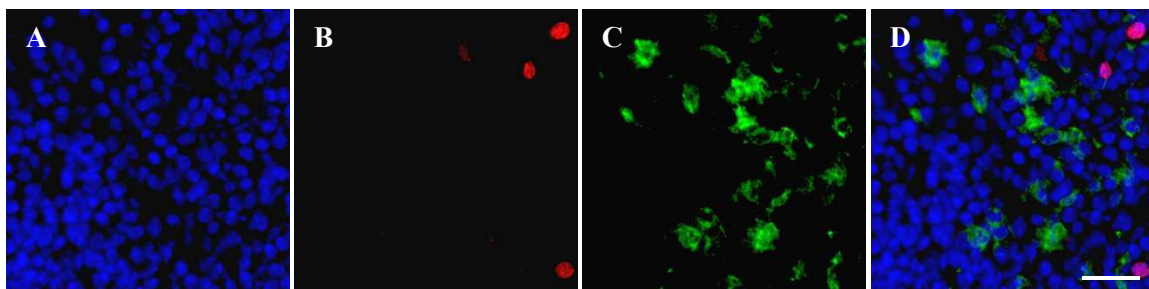


Abbildung 10: Nachweis von DZ durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen der mesenterischen Lymphknoten eines B6-Tieres
(A) DAPI, blau; (B) 5-LO, rot; (C) CD11c, grün; (D) Überlagerung von A bis C
Balken = 20 µm

Die geringe Anzahl der Zellen und Form der Zellkerne ließ vermuten, dass es sich bei diesen Zellen um Granulozyten handelte. Durch Einsatz des Granulozyten-spezifischen Antikörpers Gr-1 und CD11c konnten diese Zellen als 5-LO exprimierende Gr-1 positive und CD11c

negative Granulozyten identifiziert werden (Abb. 11). In den Lymphknoten kommen neben den myeloischen und lymphatischen DZ auch pDZ vor (siehe 1.2.2). Diese exprimieren ebenfalls GR-1, sind aber durch ihre CD11c Expression und Morphologie gut von den Granulozyten zu unterscheiden.

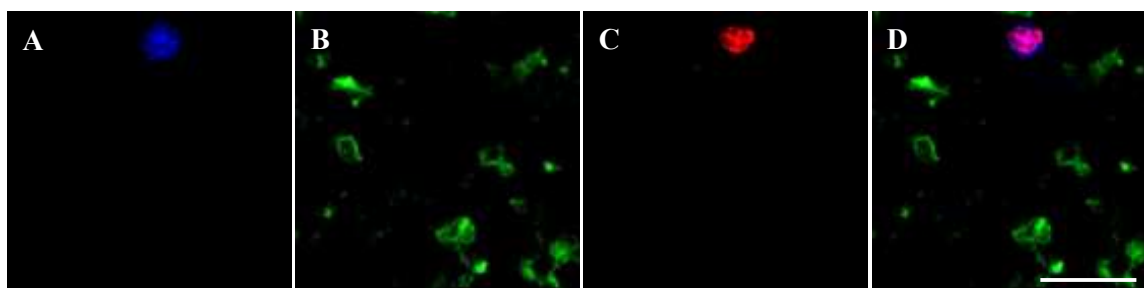


Abbildung 11: Identifizierung 5-LO positiver Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen mesenterischer Lymphknoten eines B6-Tieres
(A) GR-1, blau; (B) CD11c, grün; (C) 5-LO, rot; (D) Überlagerung von A bis C
Balken = 20 µm

Die peripheren Lymphknoten dränieren die Haut. Daher befinden sich in diesen Lymphknoten sowohl eingewanderte LZ als auch eingewanderte dermale DZ. Dabei stellt sich die Frage, ob LZ in den Lymphknoten wie in der Haut 5-LO exprimieren. Falls ja, könnte das bedeuten: 1. 5-LO könnte eine LZ spezifische Funktion im Lymphknoten haben und 2. Die 5-LO exprimierenden DZ in der Dermis sind höchstwahrscheinlich ausgewanderte LZ.

Zur Darstellung von DZ wurde CD11c eingesetzt. Im Gegensatz zu den mesenterischen Lymphknoten konnten in den peripheren Lymphknoten vereinzelt vorkommende CD11c / 5-LO positive DZ nachgewiesen werden (Abb. 12).

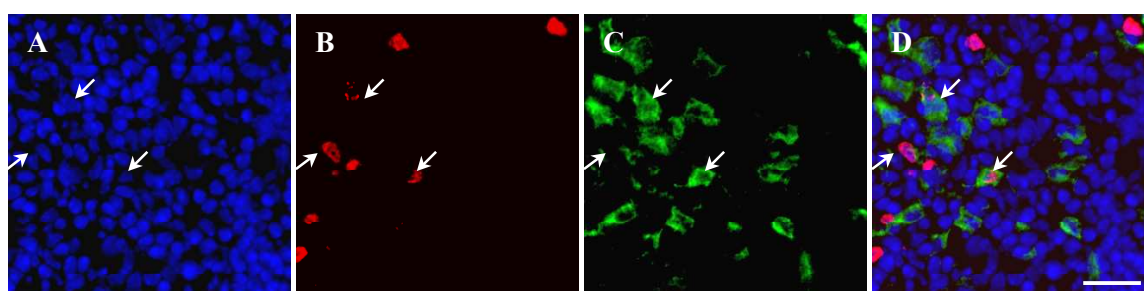


Abbildung 12: Nachweis 5-LO exprimierender DZ durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen in subkutanen Lymphknoten eines B6-Tieres
(A) DAPI, blau; (B) 5-LO, rot; (C) CD11c, grün; (D) Überlagerung von A bis C
Pfeile: CD11c / 5-LO positive DZ
Balken = 20 µm

Um LZ von anderen DZ zu unterscheiden, mussten AK-Kombinationen gewählt werden, die eine eindeutige Identifikation zuließen. LZ exprimieren CD205, welches auch auf lymphatischen DZ zu finden ist. Außerdem ist bekannt, dass LZ während ihrer Migration zu den lymphatischen Organen CD8- α hochregulieren [TRAVER et al. 2000 und DEL HOYO et al. 2002]. Eine Identifikation von eingewanderten LZ in die Lymphknoten wird durch diese beiden Marker in Verbindung mit 5-LO ermöglicht (Abb. 13), da bisher gezeigt werden konnte, dass nur LZ unter den hier gegebenen nicht-pathogenen Bedingungen 5-LO exprimieren.

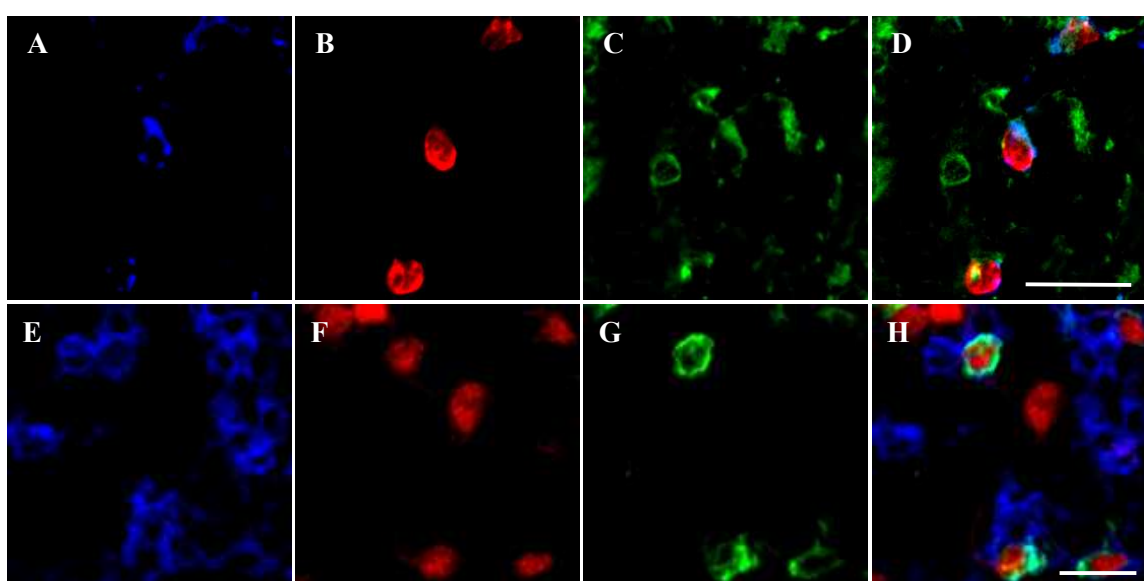


Abbildung 13: Charakterisierung der 5-LO positiven DZ durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen eines subkutanen Lymphknotens eines B6-Tieres
 (A) CD205, blau; (B) 5-LO, rot; (C) CD11c, grün; (D) Überlagerung von A bis C
 (E) CD8a, blau; (F) 5-LO, rot; (G) CD11c, grün; (H) Überlagerung von E bis G
 Balken = 20 μ m

In diesem Experiment (Abb. 13) wird deutlich, dass alle 5-LO / CD11c / CD8- α positiven DZ in enger Assoziation mit CD8- α positiven T-Zellen stehen (Abb. 13, H). Dies veranschaulicht eine Funktion der DZ: die Präsentation von Antigenen über Zell-Zellkontakte. Im dargestellten Fall geschieht dies in Assoziation mit MHC-I.

Auch in den peripheren lymphatischen Geweben konnten neben den 5-LO positiven DZ einige 5-LO exprimierende GR-1 positive Granulozyten nachgewiesen werden (Abb. 14).

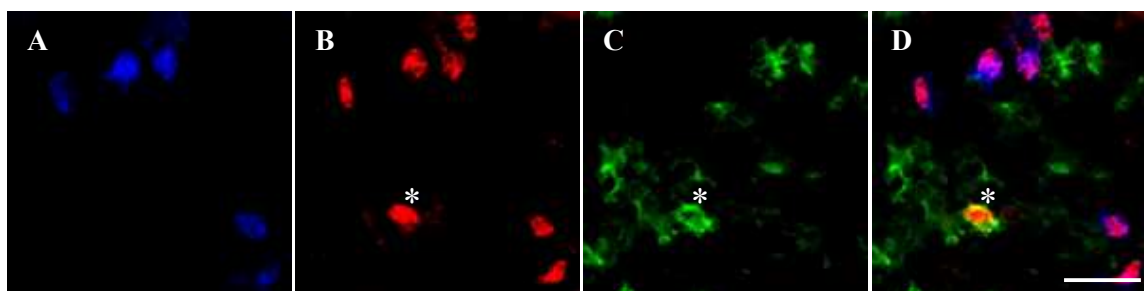


Abbildung 14: Darstellung von 5-LO positiven Zellen der subkutanen Lymphknoten eines B6-Tieres durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen
(A) GR-1, blau; (B) 5-LO, rot; (C) CD11c, grün; (D) Überlagerung von A bis C
Stern: LZ
Balken = 20 µm

Neben den bereits genannten 5-LO positiven Zellen konnten in den Lymphknoten auch CD68 / 5-LO positive Makrophagen nachgewiesen werden (Abb. 15). Diese sind CD11c negativ und befinden sich vorrangig im Kapselbereich der Lymphknoten. Bei der Ausdehnung des Kapselbereiches in Abbildung 15 handelt es sich um einen artifiziellen Schnitteffekt, da die Lymphfollikel aus der Kapsel hervortreten und der Kapselbereich schräg angeschnitten wurde.

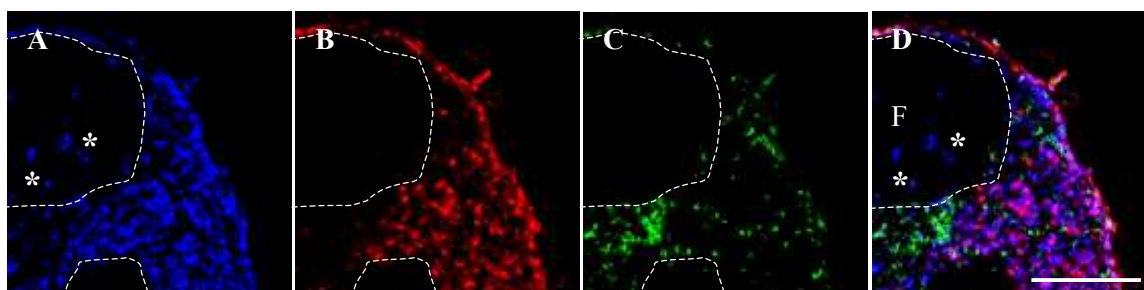


Abbildung 15: Darstellung der Verteilung 5-LO positiven Makrophagen durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen der subkutanen Lymphknoten eines B6-Tieres
(A) CD68, blau; (B) 5-LO, rot; (C) CD11c, grün; (D) Überlagerung von A bis C
Die gestrichelte Linie fasst einen Follikel (F) ein
Stern: „tingible body macrophage“
Balken = 100 µm

Während die CD68 / 5-LO positiven Makrophagen hauptsächlich auf die Kapsel beschränkt sind, verteilen sich die CD11c positiven DZ über die Sinii bis in den Paracortex (T-Zell-Bereich). Die Makrophagen in den B-Zell-Bereichen der Lymphknoten werden „tingible body macrophages“ genannt, exprimieren ebenfalls CD68 und sind 5-LO negativ (Abb. 15, E:

Stern). Dieser Sachverhalt stellt einen Gegensatz zum Humansystem dar, wo diese Makrophagen 5-LO exprimieren [SPANBROEK et al. 2000]. Neben den „tingible body macrophages“ konnten im Humansystem 5-LO exprimierende B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Obwohl die Ergebnisse der bisher durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen nicht darauf hindeuten, dass B Zellen 5-LO exprimieren, wurden B-Zellen unter Einsatz des B-Zell-spezifischer Antikörpers CD45R/B220 hinsichtlich der 5-LO Expression untersucht.

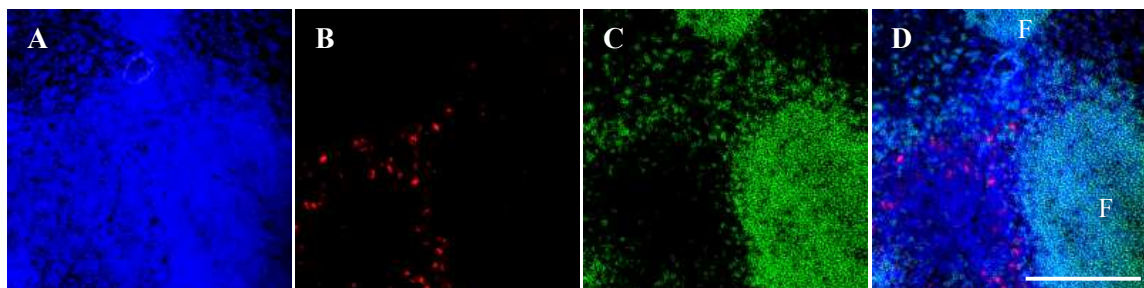


Abbildung 16: Charakterisierung der B-Zellen der subkutanen Lymphknoten eines B6-Tieres durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen
(A) DAPI, blau; (B) 5-LO, rot; (C) B220, grün; (D) Überlagerung von A bis C
F – Follikel; Balken = 200 µm

In Abbildung 16 ist deutlich zu erkennen, dass B220 positive B-Zellen der Maus 5-LO negativ sind. Das stellt einen weiteren Unterschied zum Humansystem dar, in dem B-Zellen 5-LO exprimieren [JAKOBSSON et al. 1992; SPANBROEK et al. 2000].

Das zentrale lymphatische Organ, in dem ebenfalls zahlreiche DZ vorkommen ist die Milz. Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob DZ der Milz 5-LO exprimieren.

Die immunologische Hauptfunktion der Milz ist die Vermittlung von systemischen Immunreaktionen, indem die Zellen der Milz Fremd-Antigene aus dem Blut filtern und primäre Immunantworten gegen diese Antigene initiiert werden.

Ähnlich wie in den mesenterischen Lymphknoten wurde erwartet, dass DZ der Milz keine 5-LO exprimieren, da dieses Lymphorgan nicht die Haut drainiert und bisher gezeigt werden konnte, dass keine DZ außer LZ 5-LO exprimieren.

Die Milz teilt sich in zwei funktionale Bereiche: Die rote Pulpa, in der Erythrozyten und andere Zellen abgebaut werden und die weiße Pulpa, dem immunologisch aktiven Gewebe mit den B- und T-Zell-Bereichen. Die MHC-II / CD11c positiven DZ der Milz verteilen sich um die B-Zell-Bereiche in den T-Zellreichen Regionen (Abb. 17).

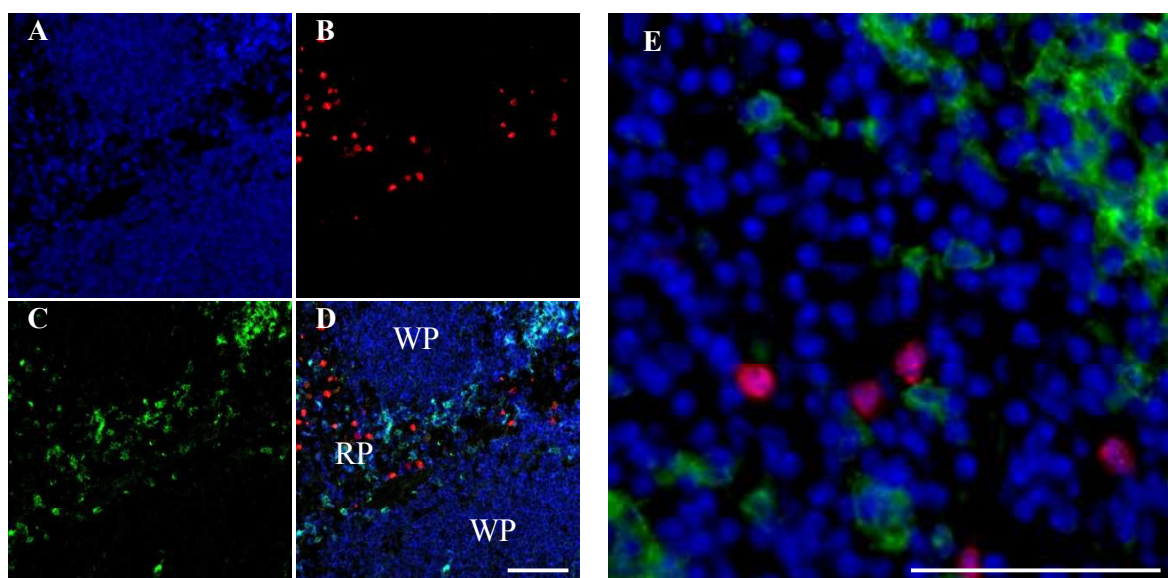


Abbildung 17: Nachweis von 5-LO positiven Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen der Milz eines B6-Tieres
 (A) MHC-II, blau; (B) 5-LO, rot; (C) CD11c, grün; (D) Überlagerung von A bis C
 (E) CD11c, grün; 5-LO, rot; DAPI, blau
 Gezeigt ist ein Ausschnitt der roten Pulpa.
 WP – weiße Pulpa; RP – rote Pulpa
 Balken = 50 µm

Es konnte nachgewiesen werden, dass die CD11c positiven DZ der Milz 5-LO negativ sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Makrophagen, die zwischen der weißen Pulpa und der roten Pulpa liegen, die CD68 / MOMA-1 positiven so genannten „metallophilic macrophages“ ebenso wie die CD68 positiven Makrophagen der roten Pulpa keine 5-LO exprimieren (Abb. 18, A).

Die 5-LO positiven Zellen erstrecken sich über die rote Pulpa (Abb. 17 und 18) und exprimieren kein CD11c. Diese Zellen konnten, wie in den peripheren Lymphknoten, als GR-1 positive Granulozyten identifiziert werden (Abb. 18, B bis E).

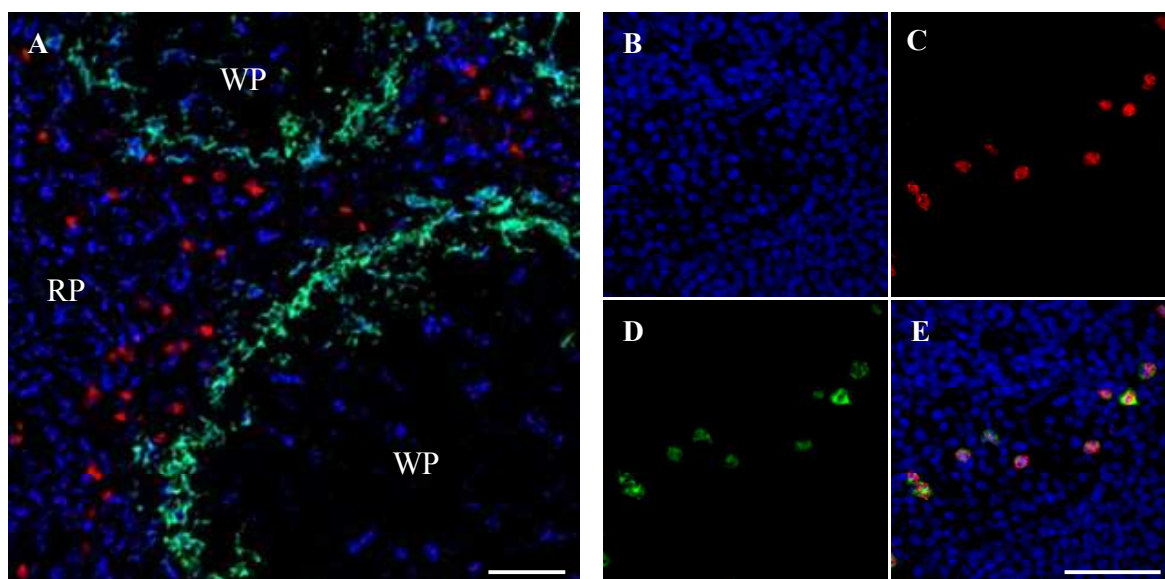


Abbildung 18: Darstellung von Makrophagen und Granulozyten der Milz eines B6-Tieres durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen
 (A) CD68, blau; 5-LO, rot; MOMA-1, grün
 (B) DAPI, blau; (C) 5-LO, rot; (D) GR-1, grün; (E) Überlagerung von B bis D
 Gezeigt ist ein Ausschnitt der roten Pulpa.
 WP – weiße Pulpa; RP – rote Pulpa; Balken = 50 µm

Nach Betrachtung der Lymphknoten und Milz lässt sich bezüglich der DZ zusammenfassend Folgendes darstellen: Unter nicht-pathogen Bedingungen wird 5-LO nur von LZ und einer Subpopulation von dermalen DZ in der Haut und von LZ der peripheren Lymphknoten exprimiert. Da LZ die 5-LO in der Epidermis und nach Einwanderung in die peripheren LK exprimieren, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den 5-LO positiven DZ der Dermis um ausgewanderte LZ handelt. In die Lymphknoten eingewanderte LZ konnten bisher nur durch aufwendige Mehrfarben-Immunfluoreszenzanalysen identifiziert werden. Der Einsatz von 5-LO spezifischen Antiseren, in Kombination mit CD11c, kann dazu beitragen LZ einfacher zu identifizieren und dadurch z.B. die Migration von der Epidermis in die peripheren Lymphknoten zu untersuchen. Die anderen 5-LO exprimierenden Zellen sind Subpopulationen von Makrophagen und Granulozyten. Es sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass Makrophagen der peripheren Gewebe, im Gegensatz zu Makrophagen der lymphatischen Organe, 5-LO exprimieren.

Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die 5-LO innerhalb des DZ-Systems der Maus einerseits eine LZ spezifische Funktion haben könnte. Andererseits übernehmen LZ in

der Epidermis möglicherweise bestimmte Funktionen von 5-LO positiven Makrophagen, da in der Epidermis sonst keine 5-LO exprimierenden Zellen vorkommen, um die durch 5-LO Metaboliten mediierten Immunantworten zu steuern. In diesem Fall hätte die 5-LO also keine spezifische LZ-Funktion sondern nur eine LZ-spezifische Expression innerhalb des DZ-Systems. Die differentielle 5-LO Expression der Makrophagen in der Peripherie, aber nicht in den lymphatischen Organen unterstützt diese These. Alle anderen DZ-Subpopulationen exprimieren keine 5-LO.

Bisher wurden DZ untersucht, deren Funktion die Induktion Antigen-spezifischer Immunreaktionen ist. Eine weitere Funktion von DZ ist die negative Selektion von T-Zellen im Thymus. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob DZ dieses primären Lymphorgans 5-LO exprimieren.

4.1.5 Nachweis 5-LO exprimierender Zellen im Thymus

Ein weiteres Organ, in dem DZ maßgeblich bei der Regulation von Immunreaktionen beteiligt sind ist der Thymus. Der Thymus stellt ein spezialisiertes und architektonisch getrenntes Mikromilieu für die Entwicklung von unreifen zu reifen T-Zellen dar. Die T-Zell-Differenzierung findet im Thymus-Cortex statt. Während der Zellreifung bildet sich ihre jeweilige Spezifität (T-Helfer-Zelle oder zytotoxische T-Zelle) aus. Die große Diversität der Antigen-Spezifitäten führt zwangsläufig auch zu solchen, die gegen körpereigene Komponenten gerichtet sind. Die autoreaktiven T-Zellen müssen eliminiert werden, da diese sonst Autoimmunreaktionen hervorrufen könnten. Die lymphatischen DZ in Thymus, die mit 70% den Hauptanteil an DZ stellen, sind für die negative Selektion autoreaktiver T-Zellen verantwortlich und gewährleisten somit die Toleranz gegen körpereigene Antigene.

Die Immunfluoreszenzanalysen ergaben, dass CD11c positive DZ des Thymus, wie die meisten DZ der anderen lymphatischen Organen, ebenfalls 5-LO negativ sind (Abb. 19, A bis D).

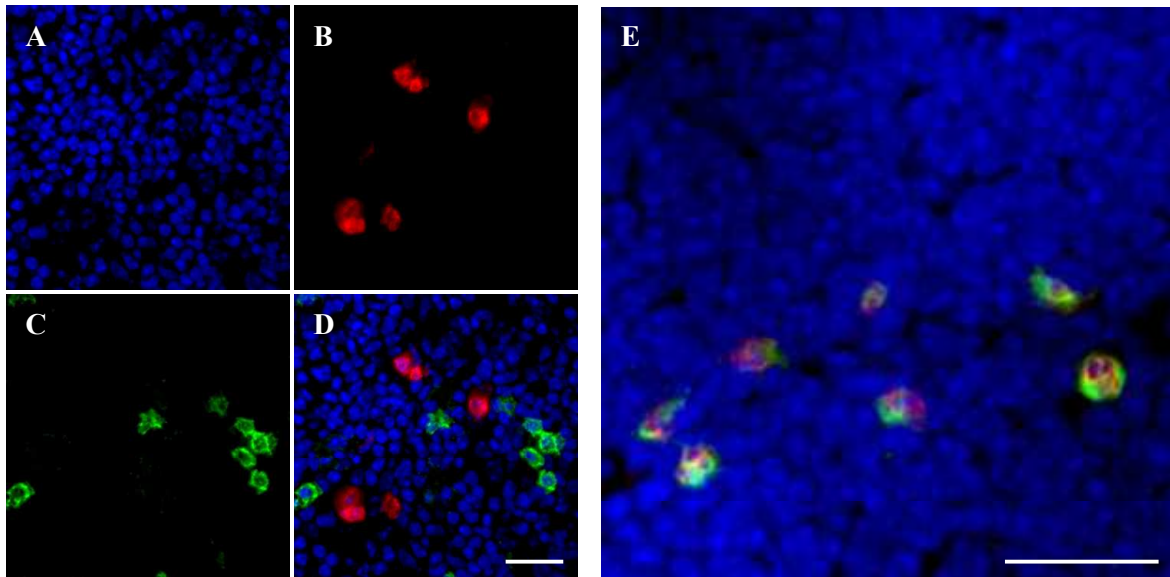


Abbildung 19: Identifizierung der 5-LO positiven Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen des Thymus eines B6-Tieres
 (A) DAPI, blau; (B) 5-LO, rot; (C) CD11c, grün; (D) Überlagerung von A bis C
 (E) GR-1, grün; 5-LO, rot; DAPI, blau
 In (A bis D) ist ein Bereich des Cortex dargestellt und in (E) ein Bereich der Medulla.
 Balken = 20 µm

Die 5-LO positiven Zellen im Thymus der Maus konnten als vereinzelt vorkommende GR-1 positive Granulozyten identifiziert werden (Abb. 19, E).

Im Thymus kommen neben den lymphatischen DZ noch die plasmazytoiden DZ (pDZ) vor, welche besonders bei der Virenabwehr eine Rolle spielen. Diese DZ-Subpopulation exprimieren neben CD11c auch den Granulozyten-Marker GR-1 (Abb. 20, A bis D) und den B-Zell-Marker B220 (Abb. 20, E bis H).

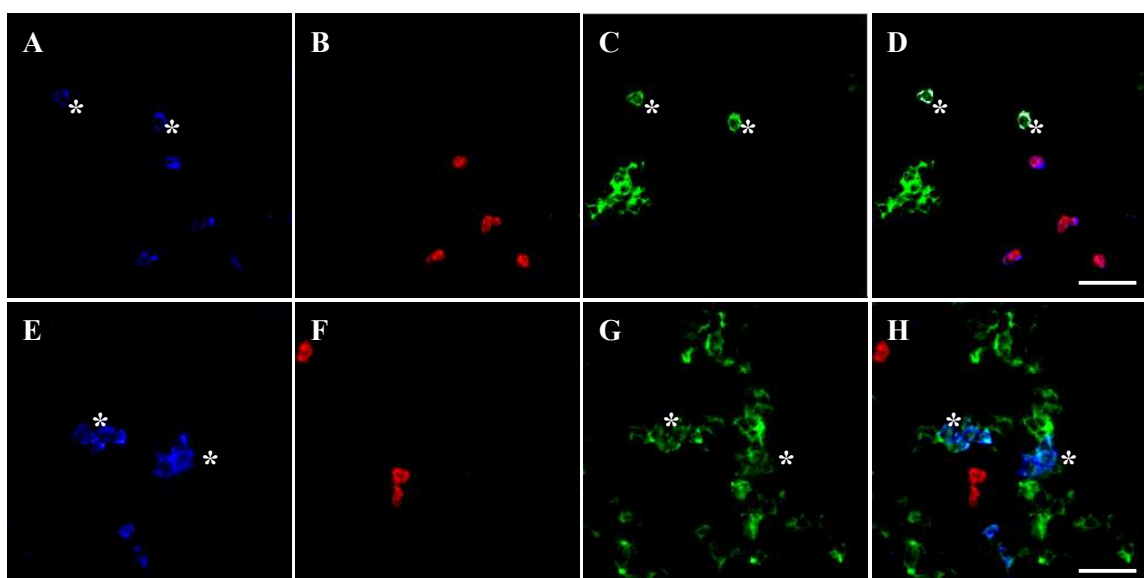


Abbildung 20: Charakterisierung der pDZ des Thymus (Cortex) eines B6-Tieres durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen
 (A) GR-1, blau; (B) 5-LO, rot; (C) CD11c, grün; (D) Überlagerung von A bis C
 (E) B220, blau; (F) 5-LO, rot; (G) CD11c, grün; (H) Überlagerung von E bis G
 Stern: plasmazytoide DZ
 Balken = 20 µm

Auch im Thymus konnte nachgewiesen werden, dass DZ beider hier vorkommenden Subpopulationen keine 5-LO exprimieren.

Durch die Immunfluoreszenzanalysen der einzelnen Organe konnte gezeigt werden, dass die 5-LO-Expression innerhalb des DZ Zellsystems auf LZ der Epidermis, eine Subpopulation von dermalen DZ und von der Haut in die peripheren Lymphknoten eingewanderte LZ beschränkt ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass LZ und von ihnen abgeleitete Zellen, die einzigen 5-LO positiven DZ-Populationen im Organismus der Maus sind.

Nachdem dies gezeigt werden konnte, stellt sich die Frage nach einer möglichen Funktion der 5-LO oder deren Stoffwechselprodukte. Hinweise aus der Literatur und die 5-LO Expression in LZ der Epidermis lassen darauf schließen, dass die 5-LO eine funktionelle Bedeutung bei der Aktivierung und nachfolgender Migration der LZ aus der Epidermis in die peripheren Lymphknoten haben könnte.

Zur weiteren Untersuchung wurden daher vergleichende Untersuchungen von Wildtyp-Mäusen und 5-LO defiziente Mäuse durchgeführt. Diese Untersuchungen sollten dazu beitragen die Funktion der 5-LO bei der Induktion von Immunreaktionen besser zu verstehen.

4.2 Genotypisierung der verwendeten Mausstämme

Als Voraussetzung für vergleichende Untersuchungen von 5-LO defizienten Mäusen und Wildtyp-Tieren muss gewährleistet sein, dass die 5-LO defizienten Tiere kein funktionelles Enzym bilden können. Dafür wurde die 5-LO Gensequenz durch Einfügung einer Antibiotikaresistenzgen-Sequenz unterbrochen [GOULET et al. 1994]. Zur Überprüfung der 5-LO Defizienz wurden stichprobenweise einzelne Tiere genotypisiert. Die DNA für die Genotypisierung wurde aus Schwanzbiopsien gewonnen (siehe 3.13). Mit dem gewonnenen Erbmateriail wurden dann PCR-Analysen (Abb. 21) durchgeführt.

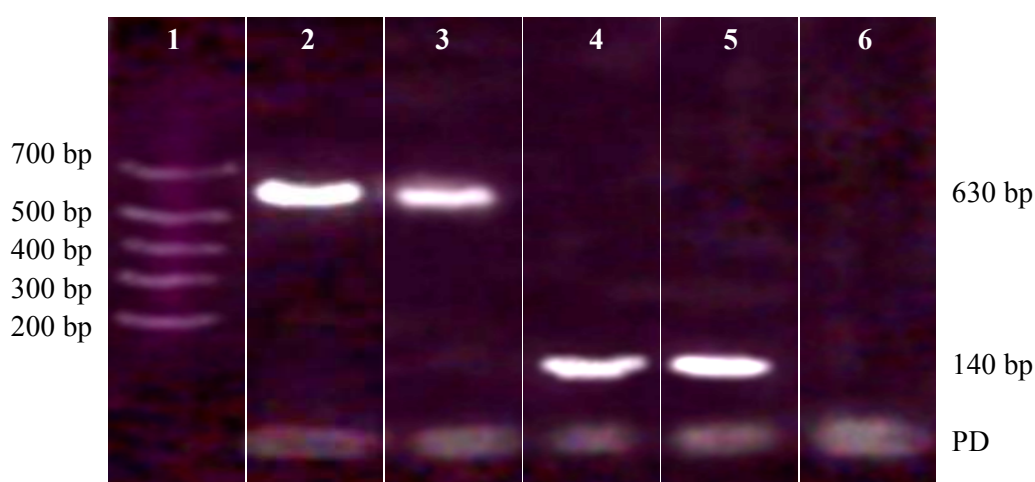


Abbildung 21: PCR Analysen zur Überprüfung der 5-LO Defizienz
Gelelektrophorese
Spur 1 – Längenstandard; Spur 2 und 3 – B6Alox5-/-
Spur 4 und 5 – B6; Spur 6 – Leerwert oder Nullkontrolle
bp – Basenpaare; PD – Primerdimere

Dabei wurden drei unterschiedliche Primer verwendet. Der 5'-Primer erkennt eine Sequenz des 5-LO Gens, die vor der inserierten DNA-Sequenz liegt. Der erste 3'-Primer erkennt eine Basenkombination innerhalb der Antibiotikaresistenzgen-Sequenz. Der zweite 3'-Primer bindet nur bei intaktem Gen der Wildtypen, da seine Erkennungssequenz durch die eingefügte Sequenz unterbrochen wird. Aus einer Kombination aller drei Primer sollte sich folgendes

Bild ergeben: Bei den Wildtyp-Tieren mit funktionellen Enzym sollte die untersuchte Sequenz 140 bp lang sein. Bei den homozygot 5-LO defizienten Mäusen umfasst die untersuchte Sequenz jedoch 630 bp, wobei das Amplifikat teilweise aus dem Antibiotikaresistenzgen und dem 5-LO Gen besteht. Amplifizierte DNA von heterozygoten Tieren würde im Gelelektropherogramm zwei Banden erzeugen, bestehend aus der 140 bp und 630 bp Sequenz. Die Stichproben ergaben, dass es sich bei den verwendeten Tieren um homozygote 5-LO defiziente Mäuse (Abb. 21 Spur 2 und 3) und um Wildtypen (Abb. 21 Spur 4 und 5) handelte.

4.3 Langerhans-Zellen der Epidermis

Um funktionelle Untersuchungen durchführen zu können, wurde zunächst der LZ Status in Wildtyp-Mäusen und 5-LO defizienten Mäusen miteinander verglichen. LZ exprimieren im Gegensatz zu anderen DZ die 5-LO unter physiologischen Bedingungen. Bei anderen DZ erfolgt die Induktion der 5-LO Expression möglicherweise nur in pathologischen Situationen. Daher lag die Vermutung nahe, dass 5-LO-Stoffwechselprodukte auch eine Funktion bei der Proliferation und / oder Differenzierung von LZ in der Epidermis aufweisen könnten. Um diese Frage zu untersuchen, wurden vergleichende Untersuchungen von LZ 5-LO-defizienter Mäuse und entsprechender Kontrolltiere durchgeführt.

Nach Hinweisen aus der Literatur weisen B6/129S 5-LO-defiziente Tiere signifikant weniger LZ in der Epidermis auf als ihre Kontrolltiere [ROBBIANI et al. 2000]. Microarray-Analysen der Arbeitsgruppe am Institut für Vaskuläre Biologie in Jena führten jedoch zu unterschiedlichen Genexpressionsprofilen bei den 5-LO defizienten Hybriden im Vergleich zu den Kontrollen. Aus diesem Grund wurden 5-LO defiziente Mäuse verwendet, die für mindestens zehn Generationen auf den C57BL/6-Stamm zurück gekreuzt wurden, um syngene Tiere zu erhalten und die beiden Mauspopulationen in funktionellen Untersuchungen vergleichen zu können. Zur Darstellung und Quantifizierung der LZ wurde die dorsale Ohrepiidermis von fünf Tieren pro Gruppe im Alter von 15 Wochen isoliert, fixiert (siehe 3.17) und aus dem mittleren Bereich ein Quadrat von fünf mal fünf Millimetern ausgeschnitten. Anschließend erfolgte eine Zweifachmarkierung mit Antikörpern gegen CD11c und MHC-II. Danach wurden die LZ mit Hilfe der konfokalen Laserscanningmikroskopie aus drei diagonal liegenden Gesichtsfeldern pro Ohrhaut-Quadrat bei einer 20fachen Vergrößerung ausgezählt.

Die erhaltenen Werte wurden als Zellen pro Quadratmillimeter Ohrepidermis dargestellt und der Mittelwert für den jeweiligen Tierstamm bestimmt (Abb. 22).

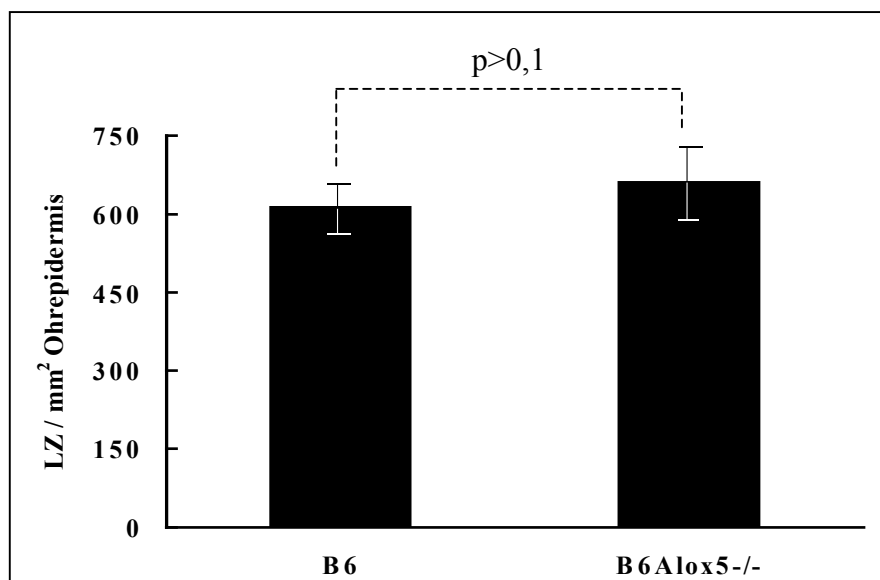


Abbildung 22: Quantitative Darstellung von LZ in einem Quadratmillimeter dorsaler Ohrepidermis
Dargestellt sind die Mittelwerte pro Gruppe (n=5) und ihre Standardabweichungen.
Statistik: Student T-Test

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch einen zweiseitig ungepaarten Student T-Test. Die Signifikanz wurde mit $p < 0,05$ definiert. Die Untersuchungen der Ohrepidermis ergaben keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Tierstämmen ($p > 0,1$). Es ist daher anzunehmen, dass die in der Literatur beobachteten Differenzen auf die genetischen Unterschiede der beiden Mausstämmen zurückzuführen sind und nicht auf einen Einfluss der 5-LO.

Von denselben Tieren, von denen die Ohrepidermis untersucht wurde, wurden auch die Milz und die peripheren Lymphknoten für eine quantitative Analyse herangezogen. Dafür wurden diese Organe entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt (siehe 3.2). Die gewonnenen Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD11c und MHC-II markiert und mit Hilfe der Durchflußzytometrie (siehe 3.16) untersucht. Um die Ergebnisse verschiedener Experimente miteinander vergleichen zu können, wurden die Daten normalisiert. Dafür wurde die Anzahl der CD11c / MHC-II positiven DZ eines jeden Individuums durch den Mittelwert der Anzahl der CD11c / MHC-II positiven DZ der Wildtyp-Mäuse des gleichen Experimentes dividiert.

Aus den erhaltenen Werten wurde dann der Mittelwert und die Standardabweichung pro Gruppe errechnet und graphisch dargestellt (Abb. 23).

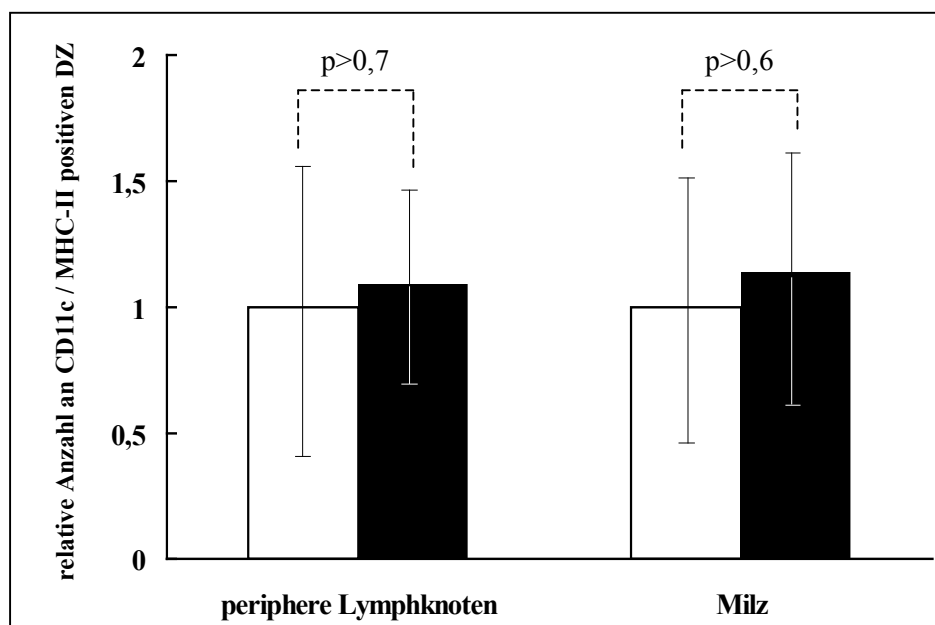


Abbildung 23: Quantitative Darstellung von DZ der subkutanen Lymphknoten und der Milz
B6-Tiere (weiße Balken) und B6Alox5-/- Tiere (schwarze Balken)
Dargestellt sind die relativierten Mittelwerte pro Gruppe (n=5) und die Standardabweichungen.
Statistik: Student T-Test

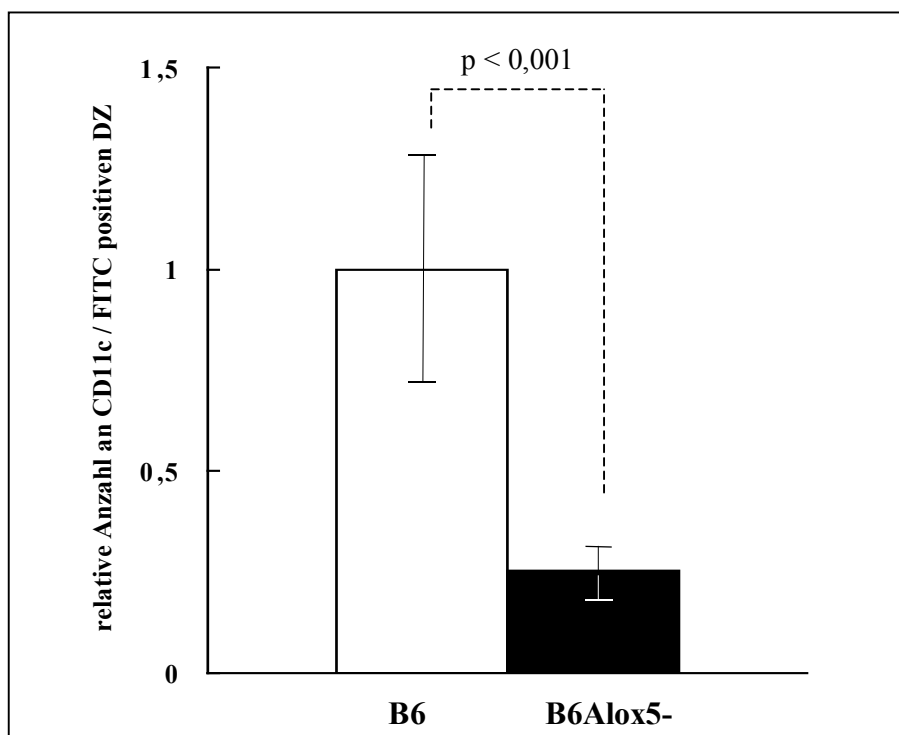
Die statistische Auswertung unter Verwendung des Student T-Test ergab auch hier keine signifikanten Unterschiede für die Anzahl von DZ in den peripheren Lymphknoten ($p > 0,7$) und in der Milz ($p > 0,6$).

Bei Mäusen, die sich lediglich durch die Abwesenheit der 5-LO unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass unter pathogenfreien Bedingungen die 5-LO keinen nachweisbaren Einfluss auf die Anzahl und Verteilung von DZ in der Epidermis und in den untersuchten lymphatischen Organen hat.

4.4 Migration von Langerhans-Zellen

Da die 5-LO unter nicht pathologischen Bedingungen keinen nachweisbaren Effekt auf die Biologie von LZ ausübt, wurden Untersuchungen durchgeführt, bei denen der Einfluss der 5-LO unter Bedingungen gezeigt werden sollte, die zu einer vollständigen Aktivierung / Reifung

und der damit verbundenen Migration der LZ führen. Zu diesem Zweck wurde eine Kontaktsensibilisierung der Haut vorgenommen. Für dieses Verfahren wurden drei Bereiche der Haut auf der dorsalen Seite einer Maus rasiert und mit dem Kontaktallergen FITC (gelöst in Azeton : Dibutyl-Phthalat, siehe 3.7) behandelt. LZ und dermale DZ werden durch diese Behandlung aktiviert, nehmen den Fluoreszenzfarbstoff auf und wandern in die regionalen Lymphknoten. Dort können sie durch CD11c Markierungen und Nachweis des aufgenommenen FITC mit Hilfe der Durchflußzytometrie quantifiziert werden (siehe 3.16). Nach 18 Stunden wurden die subkutanen Lymphknoten isoliert und die Zellen vereinzelt. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da 18 Stunden nach der FITC Applikation die maximale Akkumulation FITC positiver DZ im Lymphknoten erfolgt [ROBBIANI et al. 2000]. In der Auswertung wurden die Werte der CD11c / FITC positiven eingewanderten DZ wie oben



beschrieben normalisiert (siehe 4.3), daraus die Mittelwerte pro Gruppe ermittelt und zusammen mit den Standardabweichungen graphisch dargestellt (Abb. 24).

Abbildung 24: Quantitative Darstellung der nach FITC-Behandlung in die subkutanen Lymphknoten eingewanderten DZ
 B6-Tiere (weißer Balken) und B6Alox5^{-/-} Tiere (schwarzer Balken)
 Dargestellt sind die relativierten Mittelwerte der Tiere pro Gruppe (n=5) und die Standardabweichungen.
 Statistik: Student T-Test

Nach Kontaktsensibilisierung mit FITC wurde ein ausgeprägter Unterschied bei der Migration FITC positiver DZ deutlich. Es konnte eine 75% ($p < 0,001$) reduzierte DZ Migration von der Haut in die regionalen Lymphknoten nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die 5-LO unter pathogenen Bedingungen durch ihren Beitrag zur Mobilisierung von DZ eine wichtige Rolle bei der Induktion von Immunantworten spielt. Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass nur LZ 5-LO exprimieren und dass die 5-LO oder deren Stoffwechselprodukte maßgeblich an der Migration nach Kontaktsensibilisierung beteiligt sind. Eine weitere Frage, die es zu beantworten galt, war die Frage ob DZ die Rezeptoren für LT exprimieren und welche Bedingungen dazu führen, dass die 5-LO in DZ exprimiert wird. Um diese Fragen zu beantworten wurden *in vitro* differenzierte DZ generiert und untersucht.

4.5 *In vitro* Generation von DZ aus hämatopoetischen Vorläufern

Da die immunfluoreszenzanalytischen Befunde ergaben, dass die 5-LO Expression auf eine einzige Subpopulation von DZ beschränkt zu sein scheint und die Differenzierung von DZ *in vivo* nur unter erheblichen Aufwand verfolgt werden kann, wurden DZ *in vitro* aus Knochenmarkstammzellen generiert. Diese Zellen können unter kontrollierten Bedingungen als Modellsystem für funktionelle Studien und zur Untersuchungen über die differentielle Expression geeigneter Proteine oder mRNA, in diesem Falle der Konstituenten des 5-LO Stoffwechselwegs, genutzt werden. Dabei wurde ein Protokoll nach LUTZ et al. 1999 verwendet (siehe 3.4), die im Gegensatz zu INABA et al. 1992, die Stammzellen isolierten, alle Zellen des Knochenmarks einsetzen. Die in der Zellsuspension enthaltenen Stammzellen differenzieren unter Zugabe von GM-CSF zu DZ, kontaminierende Zellen (wie Granulozyten, T- und B Zellen, Makrophagen und andere) sterben entweder im Laufe der Kultur ab oder werden, im Gegensatz zu DZ, adhärent. Für die Analysen wurden daher nur Zellen aus dem Kulturüberstand verwendet. Die Vorläuferzellen der DZ bilden zunächst adhärente Zellaggregate, aus denen sich mit zunehmender Reifung Zellen lösen. Nach sieben Tagen sind noch relativ wenige freischwimmende DZ und einige Granulozyten im Überstand. Je älter die

Kultur wird desto mehr verschiebt sich das Verhältnis von frühen adhärenen DZ zu reifen DZ in Suspension.

Es wurden zwei verschiedene Kultursysteme mit GM-CSF und GM-CSF plus TGF- β etabliert. Durch die Zugabe von TGF- β wird die Differenzierung der DZ in eine Langerhans-ähnliche Richtung unterstützt [ZHANG et al. 1999]. Außerdem ist von TGF- β bekannt, dass es essentiell für die Etablierung von LZ in der Mausepidermis ist und dass TGF- β die 5-LO Expression in humanen DZ erhöht und deren Langerhans-ähnlichen Phänotyp unterstützt [SPANBROEK et al. 2000 und 2001].

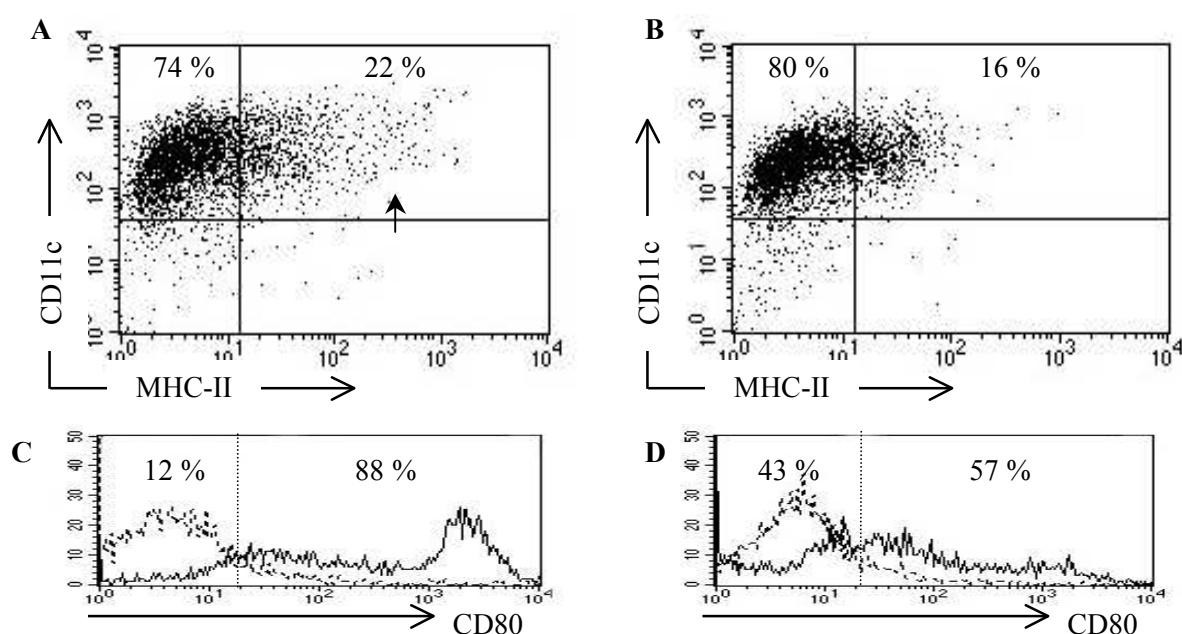


Abbildung 25: Charakterisierung der Knochenmark-generierten DZ einer B6-Maus mittels Durchflußzytometrie (A und B: Dot-Plot)
 (A und C) Knochenmarkszellen wurden mit GM-CSF für 14 Tage kultiviert
 (B und D) Knochenmarkszellen wurden mit GM-CSF plus TGF- β für 14 Tage kultiviert
 In (C) und (D) erfolgte eine Stimulation der DZ mit LPS am letzten Kulturtag.
 Gezeigt sind jeweils 10.000 Zellen.
 Pfeil: ausdifferenzierte DZ mit hoher MHC-II Expression
 Gestrichelte Kurve – Isotyp

Mit diesen Kultursystemen lassen sich innerhalb von 12-14 Tagen CD11c positive DZ mit einer Reinheit von $> 96\%$ erzeugen (Abb. 25). Die in der Literatur beschriebene inhibitorische Wirkung von TGF- β [YAMAGUCHI et al. 1997] konnte in den Zellkulturexperimenten nachvollzogen werden. TGF- β unterdrückt nicht die initiale Entwicklung der DZ, sondern eher die terminale DZ-Reifung. Aus diesem Grund zeigt der prozentuale Anteil an CD11c / MHC-

II positiven Zellen in beiden Kultursystemen kaum Unterschiede (Abb. 25, A und B). Aber im Kultursystem mit GM-CSF plus TGF- β fehlt die Subpopulation mit einer hohen MHC-II Expression als Merkmal ihrer vollständigen Ausreifung (Abb. 25, A Pfeil) fast völlig. Die Inhibition der terminalen Reifung konnte auch nach Aktivierung der DZ mit LPS durch die verminderte Expression der kostimulatorischen Moleküle wie CD40, CD80 und CD86 in den Kulturen mit GM-CSF plus TGF- β nachgewiesen werden. Hier exemplarisch an Hand der CD80 Expression (Abb. 25, C und D) gezeigt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass TGF- β die Differenzierung von CD11b positiven DZ-Vorläufern in reife DZ inhibiert und die Entstehung von LZ über einen Makrophagen / Monozyten Weg fördert [ZHANG et al. 1999]. In der vorliegenden Arbeit konnte ein Unterschied in der CD11b Expression in Abhängigkeit von TGF- β gezeigt werden. (Abb. 26, A und B). Einen Hinweis auf sich entwickelnde Langerhans-ähnliche Zellen liefert die erhöhte Expression von CD205 der DZ im Kultursystem mit GM-CSF plus TGF- β (Abb. 26, C und D).

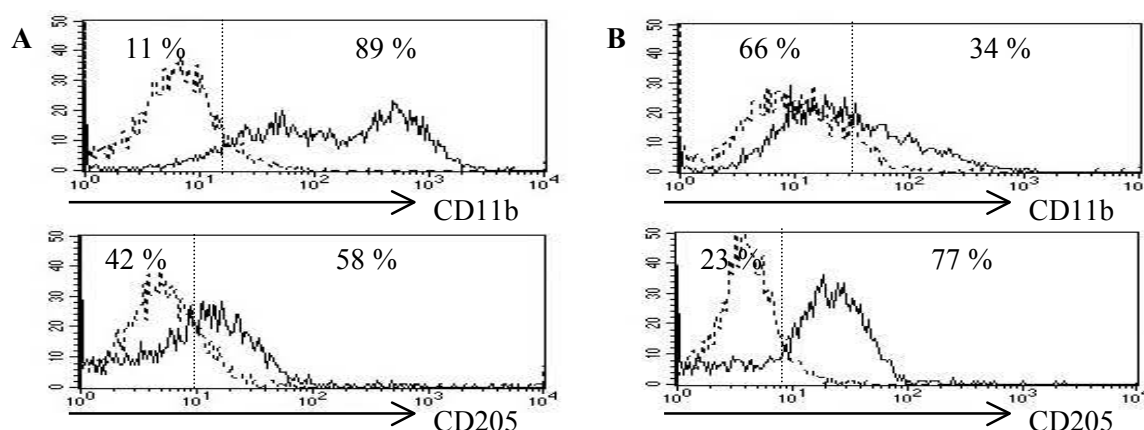


Abbildung 26: Durchflußzytometrische Analyse der Knochenmark-generierten DZ einer B6-Maus
 (A) Knochenmarkszellen wurden mit GM-CSF für 14 Tage kultiviert
 (B) Knochenmarkszellen wurden mit GM-CSF plus TGF- β für 14 Tage kultiviert
 Gestrichelte Kurve – Isotyp

Mit und ohne TGF- β entwickeln sich zwei unterschiedliche Subpopulationen von DZ. Durch Zugabe von GM-CSF entstehen DZ, welche CD11b positiv und CD205 negativ bis schwach positiv sind (Abb. 26, A) wo hingegen mit GM-CSF plus TGF- β präferenziell DZ entstehen, welche CD11b nicht oder nur schwach exprimieren und CD205 positiv sind (Abb. 26, B). Die

DZ, die mit TGF- β kultiviert wurden entsprechen den in der Literatur beschriebenen Langerhans-ähnlichen DZ.

Die Generation von Langerhans-ähnlichen DZ ist also auch bei der Verwendung des gesamten Knochenmarks möglich und nicht nur wie bisher beschreiben mit isolierten Stammzellen. Die beobachteten Effekte von TGF- β sind in beiden Kulturmodellen vergleichbar, mit Ausnahme der CD11b Expression. Die Inhibition der CD11b positiven DZ-Vorläufer wurde bisher nur bei isolierten Stammzellen beschrieben [ZHANG et al. 1999]. Die Zugabe von TGF- β erfolgte hier erst zu einem späteren Zeitpunkt (fünfter Tag der Kultur) und beeinflusste Zellen, die bereits für CD11b polarisiert waren. Das heißt in diesem Fall inhibierte TGF- β die terminale Reifung von CD11b positiven Zellen, aber nicht ihre initiale Entwicklung.

Die Beobachtung, dass die 5-LO *in vivo* keinen ersichtlichen Einfluss auf die Anzahl und Verteilung von DZ unter physiologischen Bedingungen ausübt, konnte durch Einsatz von Knochenmarkzellen, isoliert aus 5-LO defizienten Mäusen, unterstützt werden. Sowohl die differenzierten Zellen eines B6- als auch die eines B6Alox5^{-/-}-Spendertiers zeigen bezüglich ihrer Reinheit und ihres Reifegrades keine nachweisbaren Unterschiede (Abb. 25, A und B sowie Abb. 27).

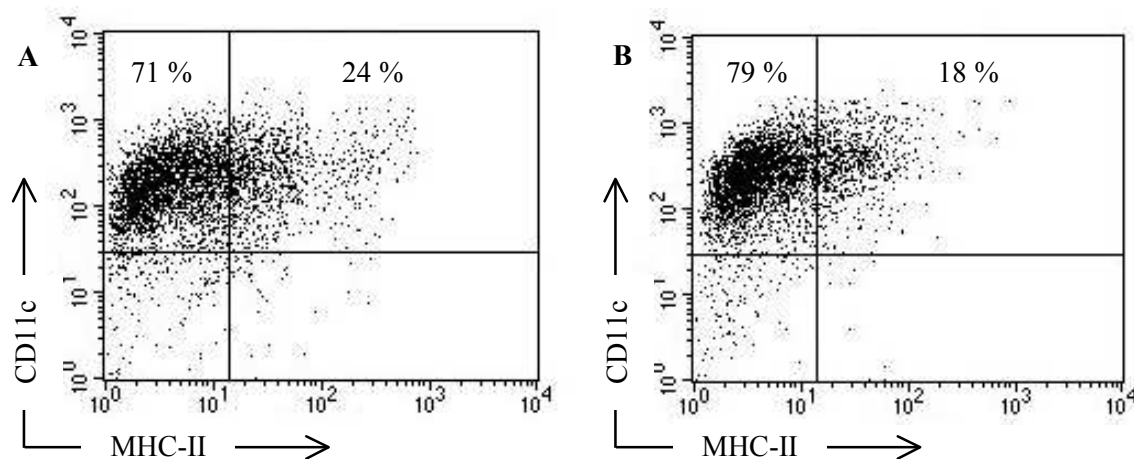


Abbildung 27: Charakterisierung der Knochenmark-generierten DZ einer B6Alox5^{-/-}-Maus mittels Durchflußzytometrie (Dot-Plots)
 (A) Knochenmarkzellen wurden mit GM-CSF für 14 Tage kultiviert
 (B) Knochenmarkzellen wurden mit GM-CSF plus TGF- β für 14 Tage kultiviert
 Gezeigt sind jeweils 10.000 Zellen.

Neben den bekannten Effekten von TGF- β auf den Differenzierungsgrad der generierten DZ in beiden Kulturvarianten, konnte hier erstmals auch ein quantitativer Unterschied gezeigt

werden. TGF- β ist bekannt für seine Eigenschaft, die Proliferation von hämatopoetischen Zellen positiv oder negativ zu beeinflussen in Abhängigkeit des Differenzierungsstadiums der Zellen, des lokalen Mikromilieus und der Zytokinkonzentration [RUSCETTI et al. 2005]. TGF- β hält die DZ in einem unreifen Zustand, wodurch die Apoptose dieser Zellen beeinflusst werden kann und diese Zellen langlebiger erscheinen. Bei dem hier verwendeten Kultursystem wurden alle Knochenmarkszellen kultiviert und durch den Einsatz von TGF- β konnte die Ausbeute an DZ um das Fünf- bis Neunfache gesteigert werden (Abb. 28). Der Einfluss von TGF- β scheint sich hier für einzelne Zellpopulationen des Knochenmarks proliferationsfördernd und / oder apoptosehemmend auszuwirken. Welche Zellen wie beeinflusst werden, ist jedoch nicht bekannt.

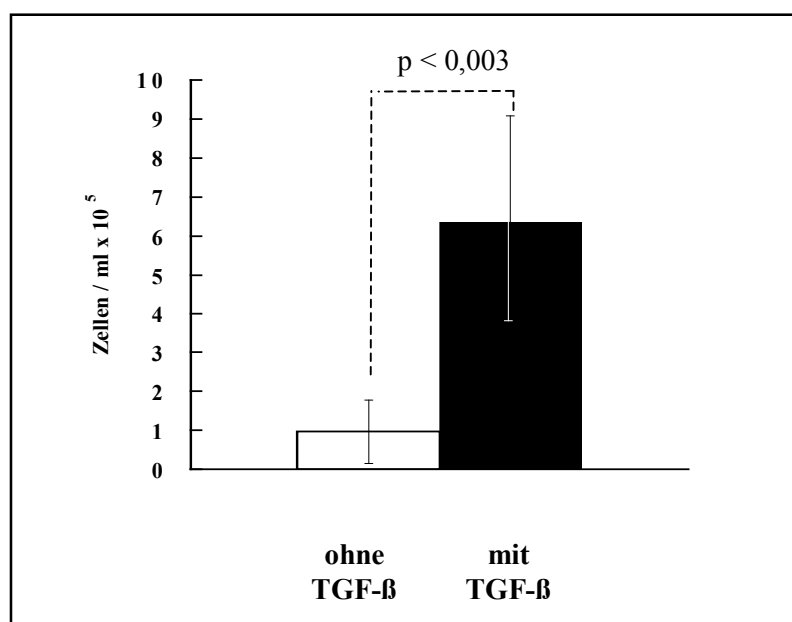


Abbildung 28: Quantitative Darstellung der Anzahl von Knochenmark-generierten DZ im Kulturüberstand von B6-Spendertieren
DZ wurden mit GM-CSF (weißer Balken); oder mit GM-CSF plus TGF- β für 14 Tage kultiviert (schwarzer Balken)
Dargestellt sind die Mittelwerte der Tiere (n=5) und die Standardabweichungen.
Statistik: Student T-Test

Da TGF- β den Langerhans-ähnlichen Phänotyp *in vitro* differenzierter DZ unterstützt und sich positiv auf die 5-LO Expression auswirkt, war zu vermuten, dass nur DZ, die mit TGF- β kultiviert wurden 5-LO exprimieren. Um die 5-LO Expression zu untersuchen, wurden daher vergleichende Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt.

Überraschend stellte sich heraus, dass unabhängig davon ob TGF- β eingesetzt wurde oder nicht, nahezu alle *in vitro* generierte DZ 5-LO exprimieren (Abb. 29).

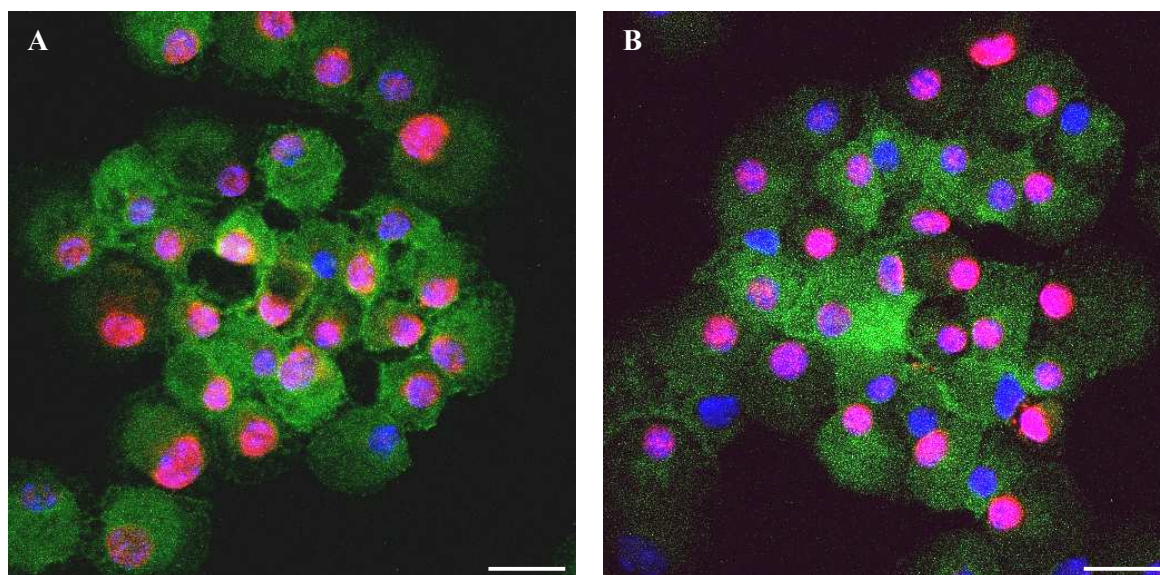


Abbildung 29: Indirekte Immunfluoreszenzanalysen von Knochenmark-generierten DZ eines B6-Tieres
 CD11c, grün; 5-LO, rot; DAPI, blau
 (A) Knochenmarkszellen wurden mit GM-CSF für 14 Tage kultiviert
 (B) Knochenmarkszellen wurden mit GM-CSF plus TGF- β für 14 Tage kultiviert
 Balken = 20 μ m

Dies steht im Gegensatz zu den *in vivo* Befunden, die zeigten, dass lediglich die LZ 5-LO exprimieren. Es besteht also die Möglichkeit, dass die DZ der Maus generell dazu in der Lage sind, 5-LO zu exprimieren, auch wenn es sich dabei nicht um LZ handelt. Auch die *in vitro* Differenzierungswege können sich stark von denen *in vivo* unterscheiden. Zumal bisher nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte, aus welchen Vorläuferzellen und /oder Zwischenstufen sich DZ *in vivo* entwickeln (s. a. Abb. 2). Wahrscheinlich spielt das umgebende Milieu die entscheidende Rolle. Dabei ist zu bedenken, dass das Knochenmark bereits eine natürliche Quelle für TGF- β darstellt [OGAWA & SEYEDIN 1991] und dass deshalb ein Einfluss dieses Zytokins auch bei der Kultur ohne künstlichen TGF- β Zusatz nicht ausgeschlossen werden kann. Zukünftige Untersuchungen unter Einsatz TGF- β neutralisierenden Antikörper oder Verwendung von TGF- β defizienten Mäusen, können helfen diese Frage zu beantworten. Durch Einsatz dieser Kultursysteme konnten, unter Einfluss von GM-CSF, aus Knochenmarkszellen DZ generiert werden, welche 5-LO exprimieren. Durch den Zusatz von TGF- β erfolgt eine Langerhans-ähnliche Differenzierung, wobei die entstehenden DZ in

einem unreifen Status gehalten werden. Damit können diese Kultursysteme eingesetzt werden, um weitere Untersuchungen durchführen zu können.

4.5.1 Untersuchung über den Einfluss der Aktivierung von Knochenmark generierten DZ auf die 5-LO Expression und Lokalisation

Die 5-LO kann je nach Zelltyp in unterschiedlichen intrazellulären Kompartimenten lokalisiert sein. Bei humanen ruhenden Neutrophilen [PETERS-GOLDEN 1998] und MonoMac-6 Zellen [WERZ et al. 2001] ist das Enzym über das gesamte Zytoplasma verteilt. Bei Knochenmark-generierten Mastzellen der Maus [CHEN et al. 1995] und humanen Alveolarmakrophagen [PETERS-GOLDEN 1998] ist die 5-LO vor allem im Kernkompartiment lokalisiert. Die intrazelluläre Verteilung der 5-LO ändert sich nach Aktivierung dieser Zellen und konnte experimentell mit der LT-Biosynthese assoziiert werden. Dazu transloziert die 5-LO z.B. bei humanen Neutrophilen, Monozyten und Peritoneal-Makrophagen aus dem Zytoplasma oder wie bei Knochenmark-generierten Mastzellen der Maus aus dem Kernkompartiment an die Kernmembran. Die intrazelluläre Verteilung der 5-LO kann daher Aussagen über den Aktivierungszustand der Zellen und / oder der 5-LO zulassen. Die Verteilung der 5-LO in der nukleären Matrix, der Kernhülle und der direkten Kernumgebung in humanen LZ wurde 1998 von Spanbroek et al. beschrieben [SPANBROEK et al. 1998]. Es war daher von Interesse, die Lokalisation der 5-LO in den verschiedenen Stadien der LZ Migration von der Epidermis in den Lymphknoten zu untersuchen. Eine Änderung der 5-LO Verteilung könnte darauf hindeuten, dass die 5-LO an der Modulation der entsprechenden Immunreaktionen beteiligt ist. Immunfluoreszenzanalysen von LZ der Mausepidermis unter nicht pathologischen Bedingungen zeigen, dass die 5-LO gleichmäßig über das Zytoplasma und den Kern verteilt vorliegt (Abb. 30, A bis D, oben). Bei 5-LO / CD11c positiven DZ in der Dermis (wahrscheinlich auswandernde LZ) verändert sich diese Lokalisation und ist dann auf den Kern beschränkt (Abb. 30, A bis D, unten). Die eingewanderten LZ in den subkutanen Lymphknoten weisen ebenfalls kernständige Lokalisation der 5-LO auf (Abb. 30, E bis H). Unter pathologischen Bedingungen, z.B. nach der FITC-Behandlung der Haut (siehe 3.7), deutet sich auch in der Epidermis der Prozess der Mobilisierung der 5-LO in Richtung Kern an. Das Enzym ist in den verbleibenden LZ nur noch im Kern nachweisbar (Abb. 30, I bis L).

Dies deutet darauf hin, dass die 5-LO nach Aktivierung und vor dem Auswandern in den Kern oder an die Kernmembran transloziert.

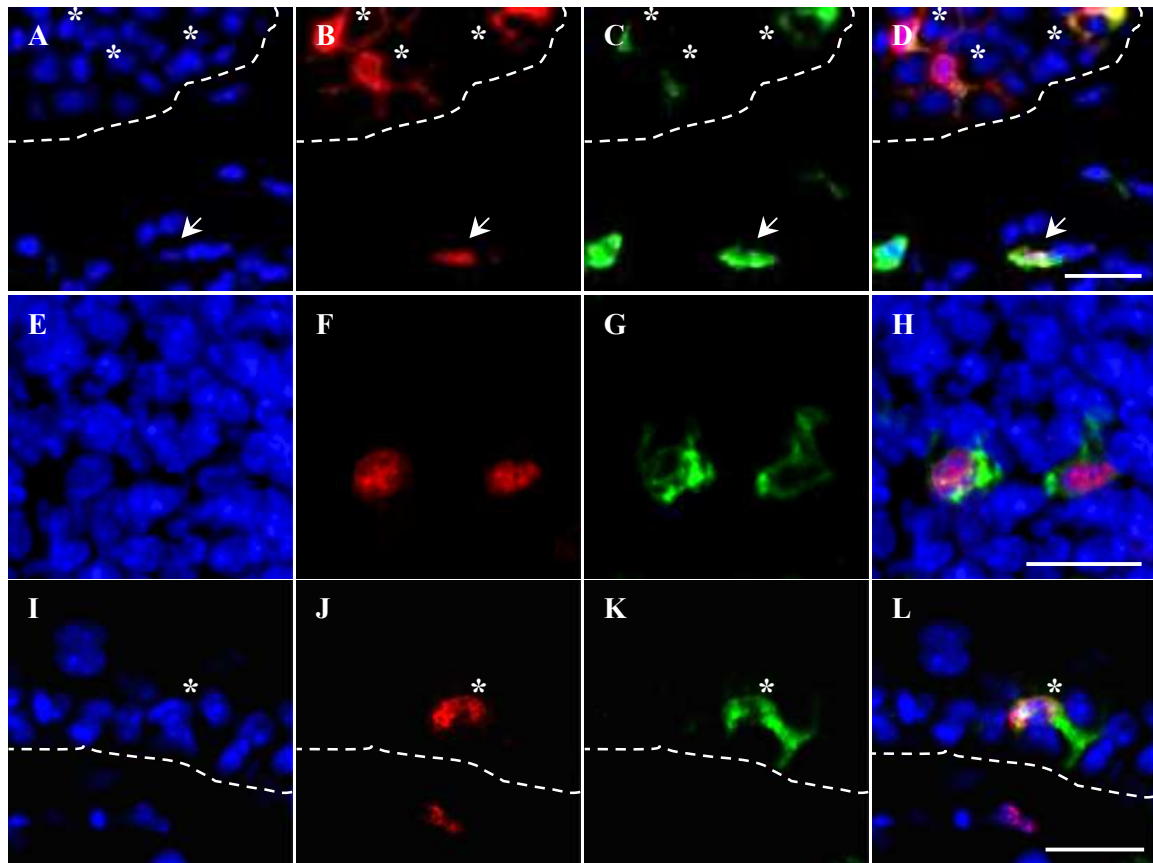


Abbildung 30: Darstellung der Lokalisation der 5-LO in DZ durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen der unbehandelten Bauchhaut (A bis D), der subkutanen Lymphknoten (E bis H) und der Ohrepidermis 18 Stunden nach FITC-Behandlung (I bis L) eines B6-Tieres
 (A) DAPI, blau; (B) 5-LO, rot; (C) CD11c, grün; (D) Überlagerung von A bis C
 (E) DAPI, blau; (F) 5-LO, rot; (G) CD11c, grün; (H) Überlagerung von E bis G
 (I) DAPI, blau; (J) 5-LO, rot; (K) MHC-II, grün; (L) Überlagerung von I bis K
 Die Grenze zwischen Epidermis und Dermis ist durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet.
 Stern: LZ; Pfeil: DZ mit kernständiger 5-LO
 Balken = 20 µm

Durch die Translokation der 5-LO an die Kernmembran nach einer Zellaktivierung besteht die Möglichkeit, dass die 5-LO dort mit dem Kernmembranprotein FLAP [WOODS et al. 1993] in Kontakt tritt. Von FLAP wird angenommen, dass es durch Bindung der freien Arachidonsäure deren Verstoffwechselung durch die 5-LO ermöglicht [MILLER et al. 1990].

Um zu zeigen, dass eine Aktivierung tatsächlich zu einer Translokation der 5-LO führt, wurden mit den *in vitro* generierten DZ Aktivierungsversuche durch die Stimulation mit LPS durchgeführt.

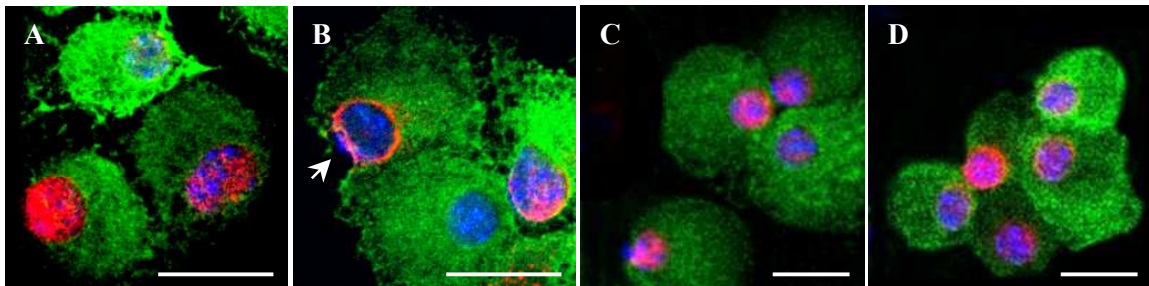


Abbildung 31: Nachweis der Translokation der 5-LO in Knochenmark-generierten DZ durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen
 (A) Knochenmarkszellen wurden mit GM-CSF für 14 Tage ohne LPS kultiviert
 (B) Knochenmarkszellen wurden mit GM-CSF für 14 Tage und am letzten Tag mit LPS kultiviert
 (C) Knochenmarkszellen wurden mit GM-CSF plus TGF- β für 14 Tage ohne LPS kultiviert
 (D) Knochenmarkszellen wurden mit GM-CSF plus TGF- β für 14 Tage und am letzten Tag mit LPS kultiviert
 DAPI, blau; 5-LO, rot; CD11c, grün
 Pfeil: Translokation
 Balken = 20 μ m

In dem Kultursystem mit GM-CSF ohne TGF- β konnte durch die Stimulation mit LPS eine Translokation der 5-LO an die Kernmembran beobachtet werden (Abb. 31, A und B).

Im Kultursystem mit GM-CSF plus TGF- β fand nach der Stimulation mit LPS keine nachweisbare Translokation der 5-LO an die Kernmembran statt (Abb. 31, C und D). Das deutet darauf hin, dass die 5-LO hier keine funktionelle Bedeutung hat oder dass die nicht erfolgte terminale Differenzierung dieser DZ für diesen Effekt verantwortlich sein könnte.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass alle *in vitro* generierten DZ 5-LO exprimieren aber das Enzym scheinbar in verschiedenen funktionellen Stadien vorliegt, soll nun untersucht werden, ob diese Zellen auch andere Konstituenten des 5-LO Stoffwechselweges und LT-Rezeptoren exprimieren und eventuell Unterschiede zwischen den Kultursystemen mit und ohne TGF- β bestehen. Da für die Rezeptoren und FLAP keine Antikörper zur Verfügung standen und somit Immunfluoreszenzanalysen ausgeschlossen waren, wurden die Zellen auf mRNA Ebene mittels RT-PCR untersucht.

4.5.2 Untersuchung von Knochenmark-generierten DZ durch RT-PCR

Nachdem gezeigt werden konnte, dass *in vitro* differenzierte DZ 5-LO exprimieren, stellte sich die Frage, ob auch die anderen Konstituenten des 5-LO Stoffwechselweges inklusive der LT-Rezeptoren exprimiert werden. Zu diesem Zweck wurden quantitative RT-PCR Analysen von *in vitro* kultivierten Knochenmarkzellen durchgeführt.

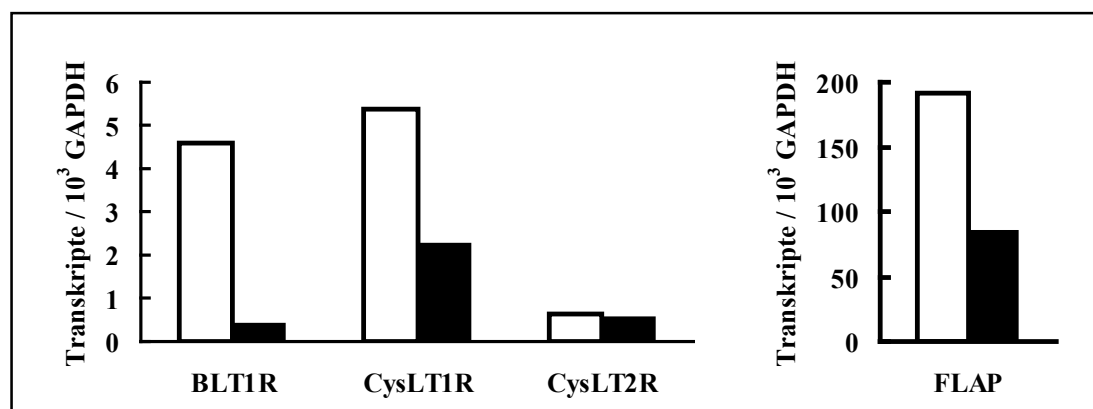


Abbildung 32: Quantitative Darstellung der Transkripte einzelner Konstituenten des 5-LO Stoffwechselweges in Knochenmark-generierten DZ einer B6-Maus
 Weiße Balken: Knochenmarkzellen wurden mit GM-CSF für 14 Tage kultiviert
 Schwarze Balken: Knochenmarkzellen wurden mit GM-CSF plus TGF-β für 14 Tage kultiviert
 Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

In vitro mit GM-CSF kultivierte DZ exprimieren alle untersuchten Konstituenten des 5-LO Stoffwechselweges auf mRNA-Ebene (Abb. 32). Das bedeutet, dass diese Zellen alle Voraussetzungen erfüllen, um Arachidonsäure über FLAP der 5-LO zu präsentieren und über die Rezeptoren auf LT zu reagieren.

Wie in Abbildung 32 deutlich wird, hat TGF-β einen inhibierenden Einfluss auf die Expression der Konstituenten des 5-LO Stoffwechselweges.

Ob TGF-β einen direkten Einfluss auf diese Expression hat oder indirekt, wie beschrieben [YAMAGUCHI et al. 1997], über die Inhibierung der Reifung wirkt, kann hier nicht geklärt werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass unter dem Einfluss von TGF-β eine DZ-Population generiert wird, welche die Rezeptoren generell nicht oder nur sehr gering exprimiert. Auch FLAP zeigt unter dem Einfluss von TGF-β eine verminderte Expression.

Die niedrige Expression der CysLT₂-R mRNA in beiden Kultursystemen ist wahrscheinlich auf kontaminierende Zellen im Kulturüberstand, z.B. Granulozyten, zurückzuführen, die vereinzelt in der Kultur nachgewiesen werden konnten.

RT-PCR Analysen isolierter Epidermen (siehe 3.3) zeigten, dass mRNA des BLT₁-R und CysLT₁-R sehr prominent exprimiert werden, die CysLT₂-R mRNA jedoch nur sehr schwach (Abb. 33).

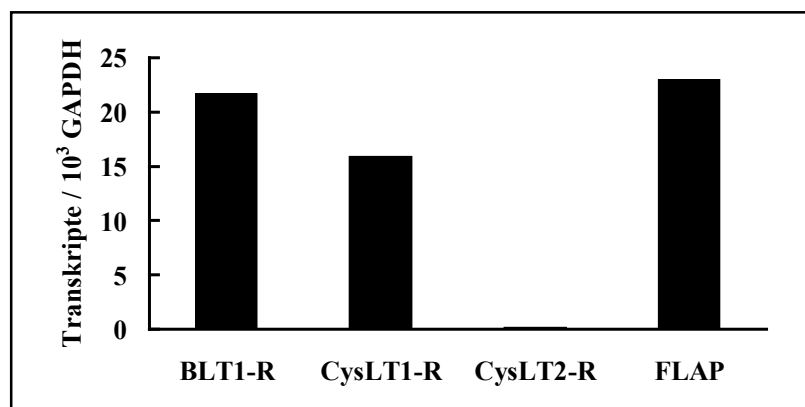


Abbildung 33: Quantitative Darstellung der Transkripte einzelner Konstituenten des 5-LO Stoffwechselweges der Epidermis einer B6-Maus
Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Das beobachtete Verhältnis der FLAP Expression gegenüber der Rezeptorexpression im Vergleich zu den *in vitro* kultivierten DZ könnte darauf hindeuten, dass nicht nur LZ diese Rezeptoren in der Epidermis exprimieren sondern auch andere dort ansässige Zellen. Die CysLT₁-R Expression in der Epidermis entspricht den Betrachtungen der Arbeitsgruppe von Maekawa [MAEKAWA et al. 2001].

In vitro generierte DZ exprimieren alle hier untersuchten Konstituenten des 5-LO Stoffwechselweges. Unter Einfluss von TGF- β differenzierte Langerhans-ähnliche DZ zeigen dabei eine verminderte Expression der LT-Rezeptoren und FLAP. Außerdem hat TGF- β einen inhibitorischen Einfluss auf die Reifung dieser Zellen. Die Differenzierung der DZ geht mit einer Hochregulation der 5-LO Stoffwechselkonstituenten einher. Das deutet darauf hin, dass besonders die reifen DZ / LZ LT und deren Rezeptoren exprimieren und auch darauf reagieren. Unreife DZ (wie LZ der Epidermis) können noch nicht über die LT-Rezeptoren reagieren und würden somit an der LT mediierten Migration in die Lymphknoten gehindert. Das Expressionsprofil der 5-LO Konstituenten der Epidermis im Vergleich zu den *in vitro*

generierten DZ deutet an, dass nicht nur LZ, sondern auch andere epidermale Zellen die Rezeptoren, im Gegensatz zu FLAP, exprimieren, was auf einen autokrinen und parakrinen Wirkmechanismus der LT hindeutet.

4.5.3 Kalzium-Messung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass *in vitro* differenzierte DZ Transkripte des CysLT₁-R und BLT₁-R exprimieren und die relativen mRNA Mengen durch die Kulturbedingungen beeinflusst werden, stellte sich die Frage, ob diese Rezeptoren auch auf Proteinebene exprimiert werden. Da für die LT-Rezeptoren keine geeigneten Antiseren zur Verfügung standen wurden funktionelle Untersuchungen durchgeführt.

Die Aktivierung der Rezeptoren durch LT führt zu einem Anstieg der intrazellulären freien Kalziumkonzentration in den Zellen und kann mit Hilfe des ratiometrischen Ca²⁺-Fluoreszenzindikators Fura-2 und eines Fluoreszenzspektrometer gemessen werden (siehe 3.9).

Hierfür wurden jeweils 5×10^5 *in vitro* kultivierte DZ mit LTB₄, LTD₄ oder Ethanol als Lösungsmittelkontrolle stimuliert.

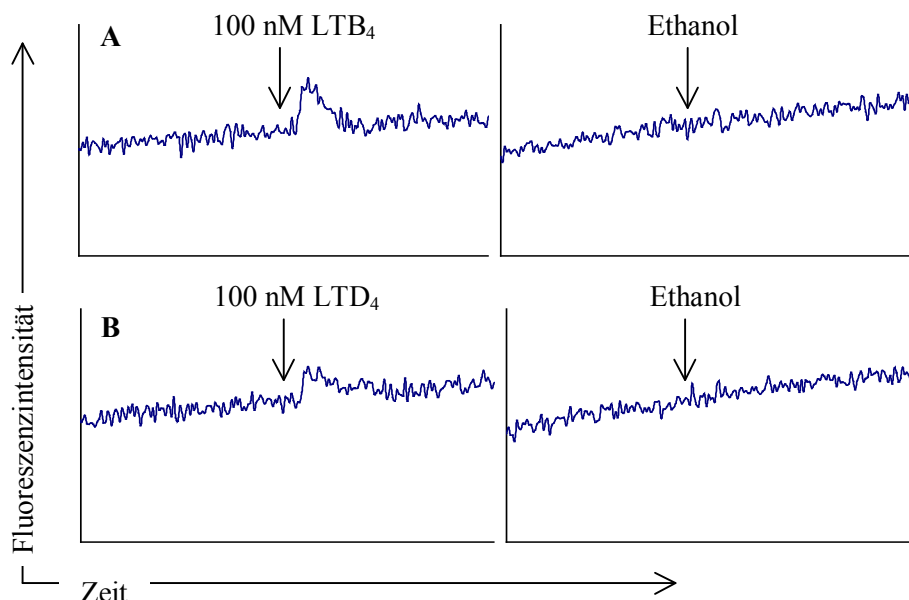


Abbildung 34: LT-induzierte Kalziummobilisierung in Knochenmark-generierten DZ einer B6-Maus
(A) und (B) Knochenmarkszellen mit GM-CSF für 14 Tage kultiviert.

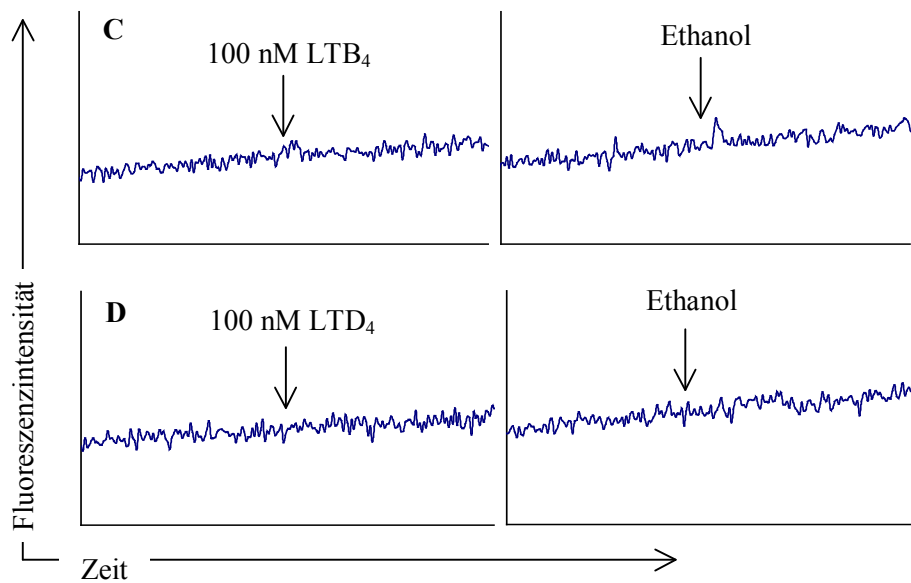


Abbildung 34: LT-induzierte Kalziummobilisierung in Knochenmark-generierten DZ einer B6-Maus
(C) und (D) Knochenmarkszellen mit GM-CSF plus TGF- β für 14 Tage kultiviert.

Durch Stimulierung der nur mit GM-CSF behandelten DZ mit 100nM LTB₄ wurde ein robustes Kalziumsignal induziert (Abb. 34, A). 100 nM LTD₄ induzierte in DZ gleicher Kulturbedingungen ebenfalls ein Signal (Abb. 34, B). Bei den DZ der Kulturvariante mit GM-CSF plus TGF- β löste 100 nM LTB₄ keine über der Ethanolkontrolle liegende Ca²⁺-Mobilisierung aus (Abb. 34, C). Nach Zugabe von 100 nM LTD₄ konnte ebenfalls keine Ca²⁺-Mobilisierung nachgewiesen werden (Abb. 34, D). Die durchgeführten Ethanolkontrollen ergaben keine signifikanten Ca²⁺-Signale.

Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* generierten DZ mit GM-CSF ohne TGF- β funktionelle LT-Rezeptoren für LTB₄ und die CysLT exprimieren. Im Gegensatz dazu konnte in den DZ der Kultursysteme mit GM-CSF plus TGF- β nur geringe Menge der Rezeptor mRNA nachgewiesen werden, LT induzierte Kalzium-Signale konnten jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die LT-Rezeptor Expression scheint differenzierungsabhängig zu sein, da die mit TGF- β generierten Langerhans-ähnlichen DZ nur eine geringe Expression zeigen und sich in einem unreifen Stadium befinden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoren der Langerhans-ähnlichen Zellen, wahrscheinlich aufgrund der niedrigen Expression, keine

funktionelle Bedeutung aufweisen. Die Möglichkeit, dass LT-Rezeptoren in TGF- β behandelten DZ einen Signaltransduktionsweg induzieren, der nicht über Ca^{2+} -Mobilisierung nachweisbar ist, erscheint unwahrscheinlich, da dieses in keinem bisher untersuchten zellulären Systemen jemals beobachtet wurde.

TGF- β ist dafür bekannt, dass es die Reifung von DZ inhibiert. Das heißt bei der Kulturvariante mit dem Zytokin wurden unreife DZ generiert, welche die Rezeptoren noch nicht exprimieren. Diese Ergebnisse deuten an, dass die Rezeptoren erst mit zunehmender Reife der DZ an Bedeutung gewinnen, wie in der Kulturvariante ohne TGF- β gezeigt. Das gilt scheinbar auch für die Aktivität der 5-LO, da nur in der Kulturvariante ohne TGF- β eine Translokation der 5-LO an die Kernmembran beobachtet werden konnte (siehe 4.5.1)

5. Diskussion

Das wesentliche Resultat der hier vorliegenden Arbeit ist der Nachweis der 5-LO Expression in LZ der Epidermis, Dermis und der subkutanen Lymphknoten. Alle anderen DZ Subpopulationen der Peripherie und der lymphatischen Organe sind 5-LO negativ. Neben den LZ konnten ebenfalls Gewebemakrophagen und Granulozyten als 5-LO exprimierende Zellen identifiziert werden. Im Gegensatz dazu exprimieren Makrophagen innerhalb der lymphatischen Organe wie Milz, Lymphknoten oder Peyersche Plaques keine 5-LO.

Durch den Einsatz von 5-LO defizienten Mäusen wurden funktionelle Analysen der 5-LO möglich. Unter nicht pathogenen Bedingungen konnte kein Einfluss der 5-LO auf die Anzahl und Verteilung der LZ der Haut sowie der DZ der peripheren Lymphknoten und der Milz nachgewiesen werden. Nach einer Kontaktsensibilisierung zeigte sich bei den 5-LO defizienten Tieren jedoch eine deutlich verminderte Anzahl an in die subkutanen Lymphknoten eingewanderten DZ. Dieser Befund zeigt erstmals eine direkte Beteiligung der 5-LO bzw. deren Stoffwechselprodukte bei der Mobilisierung von DZ in der Haut.

Durch die *in vitro* Generation von DZ konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass verschiedene DZ-Subtypen in der Lage sind 5-LO zu exprimieren. Darüber hinaus konnte eine differenzierungsabhängige Expression funktioneller CysLT₁-R und BLT₁-R nachgewiesen werden.

Diese Untersuchungen können dazu beitragen, die Funktion der 5-LO und ihrer Stoffwechselprodukte in den LZ der Maus zu identifizieren und die Mechanismen der Migration dieser DZ auf molekularer Ebene aufzudecken.

5.1 5-LO Expression in verschiedenen Zellpopulationen der Maus

Das DZ-System der Maus umfasst zahlreiche Subpopulationen an DZ, die sich partiell durch ihre Funktionen und / oder das Vorkommen in verschiedenen lymphatischen und peripheren Geweben unterscheiden. Zur Identifikation 5-LO exprimierender DZ wurden stellvertretend für periphere Gewebe-DZ die DZ der Haut, der Atemwege und des Darmes untersucht.

Diese Untersuchungen wurden durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen (siehe 3.17) mit Hilfe der konfokale Laserscanningmikroskopie (siehe 3.18) gewonnen. Durch den Einsatz von

Gewebeproben 5-LO defizienter Mäuse konnte nachgewiesen werden, dass das polyklonale anti-5-LO Antiserum keine unspezifischen Bindungen aufweist (Abb. 4, I bis L).

In der Haut der Maus existieren mehrere Zellspezies, von denen bekannt ist, dass sie putativ in der Lage sind 5-LO zu exprimieren. Bei diesen Zellen handelt es sich vorwiegend um Makrophagen und LZ. 5-LO exprimierende Makrophagen der Maus wurden bisher in den Alveolen [CHEN et al. 1995], im Peritoneum und in der Adventitia von Aorten [ZHAO et al. 2004] beschrieben. 5-LO exprimierende LZ wurden bisher nur in der humanen Epidermis und Dermis nachgewiesen [SPANBROEK et al. 1998]. Es war daher zunächst von Interesse nachzuweisen, ob diese Zellpopulationen auch in der Haut der Maus 5-LO exprimieren. Zur Identifikation 5-LO exprimierender Zellen wurden Antikörperkombinationen ausgewählt, die es ermöglichten, DZ und Makrophagen voneinander zu unterscheiden, da auch Makrophagen zahlreiche Oberflächen- und intrazelluläre Antigen exprimieren, die ebenfalls in DZ nachgewiesen werden können, z.B. MHC-II [DUPASQUIER et al. 2004]. Zur Identifikation von 5-LO exprimierenden LZ der Epidermis wurde eine Markerkombination von Langerin und MHC-II (Abb. 4, A bis D) sowie MHC-II, CD11c und 5-LO (Abb. 4, E bis F) verwendet. Zur Unterscheidung von DZ und Makrophagen der Dermis wurde MHC-II, CD11c und 5-LO in Kombination eingesetzt (Abb. 6). Makrophagen der Haut exprimieren kein CD11c und können so in Kombination mit MHC-II von DZ unterschieden werden (siehe 1.2.2). In der Epidermis konnten nur die als LZ identifizierten Zellen als 5-LO positive Zellen nachgewiesen werden. In der Dermis konnten zwei MHC-II positive Zellpopulationen mit 5-LO Expression gezeigt werden. Diese unterscheiden sich in der Expression von CD11c. Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei der 5-LO positiven / CD11c negativen Population um einen Makrophagen-Subtyp handelt, während die 5-LO / CD11c positive Population DZ repräsentiert. Außerdem konnte eine DZ-Population identifiziert werden, die CD11c positiv ist, aber keine 5-LO exprimiert. Dieses Ergebnis deutet an, dass nicht alle DZ-Subtypen 5-LO exprimieren, sondern nur LZ der Epidermis und eine Subpopulation von DZ der Dermis. Hierbei liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen DZ um LZ handelt, die aus der Epidermis in die peripheren Lymphorgane migrieren. Untersuchungen anderer peripherer Gewebe wie der Trachea (Abb. 7, A bis D) und die Darmschleimhaut (Abb. 8) unterstützten die in der Haut erhaltenen Ergebnisse. In diesen Geweben konnten nur Makrophagen (Abb. 7,

E bis H und Abb. 9) und vereinzelt vorkommende Granulozyten als 5-LO exprimierende Zellen nachgewiesen werden.

Bei den bisher beschriebenen DZ der peripheren Gewebe handelt es sich um LZ und myeloische DZ. Daher galt nun das Interesse der Frage nach DZ-Subpopulationen in den lymphatischen Organen. DZ der Peripherie haben nach ihrer Migration in die lymphatischen Organe eine andere Funktion als in der Peripherie. In den Geweben nehmen sie Antigene auf und in den Lymphorganen präsentieren sie diese antigenspezifischen T-Zellen. Neben den bisher untersuchten myeloischen DZ der peripheren Gewebe übernehmen lymphatische DZ andere Funktionen bei der Vermittlung von Immunantworten (siehe 1.2.2) und unterscheiden sich deshalb möglicherweise in ihrer 5-LO Expression von den myeloischen DZ. Von allen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Lymphorganen konnte nur in den subkutanen Lymphknoten eine Subpopulation von 5-LO positiven DZ nachgewiesen werden (Abb. 12). Diese DZ tragen eine Kombination von Merkmalen wie sie bei eingewanderten LZ beschrieben wurden (CD11c, MHC-II, CD205, Abb. 13, A bis D und CD8- α , Abb. 13, E bis F). Dazu ist anzumerken, dass LZ der Epidermis wenig bis kein CD8- α exprimieren sondern dieses Oberflächenmolekül differenzierungsabhängig während der Migration zu den Lymphknoten hochregulieren [ANJUERE et al. 1999]. In allen anderen untersuchten lymphatischen Geweben konnte kein 5-LO exprimierender DZ nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob es sich um myeloische, lymphatische oder plasmazytoide DZ handelt. Der Ursprung der LZ wird kontrovers diskutiert. Einerseits gibt es Anhaltspunkte für einen lymphatischen Ursprung wie die Induzierbarkeit von CD8- α [TRAVER et al. 2000 und DEL HOYO et al. 2002], aber andererseits spricht die Expression von CD11b [MERAD et al. 2000] für einen myeloischen Ursprung. Die 5-LO Expression der LZ könnte somit als weiteres Kriterium für den myeloischen Ursprung gedeutet werden, da in der Maus nur Zellen der myeloischen Reihe wie Granulozyten und Makrophagen das Enzym bilden.

Auch die Makrophagen der Lymphorgane zeigen bezüglich ihrer 5-LO Expression Unterschiede. Die Makrophagen der Kapselregion eines Lymphknotens sind 5-LO positiv, während die Makrophagen im Inneren des Lymphknotens, z.B. die „tingible body macrophages“ der Follikel, 5-LO negativ sind. Die Kapselmakrophagen übernehmen die gleichen Funktionen wie andere Makrophagen in der Peripherie, z.B. im Peritoneum und exprimieren wahrscheinlich deshalb auch 5-LO. Die „tingible body macrophages“

phagozytieren apoptotische Zellen innerhalb der Germinalen Zentren [BAUMANN et al. 2002], erfüllen also eine andere Funktion als die Makrophagen der Kapsel und benötigen dafür scheinbar keine 5-LO. Möglicherweise bewirkt das Enzym hier Funktionsunterschiede. Alle bisher beobachteten Effekte der 5-LO und ihrer Konstituenten, wie die Chemotaxis von Granulozyten [FORD-HUTCHINSON et al. 1980] und T-Zellen (siehe auch 1.3.2), der Einfluss auf das vaskuläre System [Übersicht in SAMUELSSON et al. 1987 und BRINK et al. 2003] (Abb. 36) und die Migration von LZ sind Vorgänge in der Peripherie. Innerhalb der lymphatischen Organe spielen diese Effekte keine Rolle und vielleicht exprimieren Makrophagen innerhalb dieser Organe deshalb keine 5-LO. Das heißt 5-LO Metabolite scheinen im Bezug auf die Makrophagen und den meisten DZ unter pathogenfreien Bedingungen keinen Einfluss auf Immunreaktionen in den Lymphorganen zu haben. Die 5-LO mediert möglicherweise Reaktionen des angeborenen Immunsystems, welche außerhalb der lymphatischen Organe stattfinden. Die Makrophagen scheinen die 5-LO auch differentiell zu exprimieren in Abhängigkeit des Mikromilieus und / oder der Differenzierung. Dies weist auf einen möglichen Regulationsmechanismus der 5-LO in Makrophagen hin.

Die Expression der 5-LO in den LZ der Maus entspricht den Verhältnissen im Humansystem, wo gezeigt werden konnte, dass LZ der Epidermis, CD1a positive DZ der Lymphknoten und auch aktivierte DZ der Lymphknoten 5-LO exprimieren. Ob es sich bei diesen DZ um differenzierte LZ oder andere myeloische DZ handelte, konnte nicht eindeutig geklärt werden [SPANBROEK et al. 1998 und 2000].

Obwohl in der Vergangenheit Langerin als LZ spezifischer Marker identifiziert wurde, zeigen neuere Untersuchungen, dass nahezu alle CD8- α positiven DZ dieses Molekül exprimieren, wenn auch in unterschiedlichen Mengen [KISSENPFENNING et al. 2005]. Die eindeutige Identifikation von LZ außerhalb der Epidermis ist daher nur über aufwendige Kombinationen verschiedener Marker bedingt möglich. Der Aspekt, dass die 5-LO Expression in DZ Populationen der Maus auf LZ beschränkt zu sein scheint, könnte entscheidend dabei helfen diese Zellen während ihrer Migration in die subkutanen Lymphknoten zu identifizieren und dadurch beizutragen, spezifische Funktionen von LZ zu untersuchen.

5.2 Einfluss der 5-LO auf die Biologie der Langerhans-Zellen

Nachdem geklärt werden konnte, dass nur LZ innerhalb des DZ-Systems der Maus 5-LO exprimieren, stellte sich die Frage nach der funktionellen Bedeutung des Enzyms zunächst unter pathogenfreien Bedingungen.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die 5-LO eine Rolle bei der Differenzierung und der Proliferation spielt, diese jedoch abhängig vom Zelltyp ist. 5-LO unterstützt z.B. die Differenzierung von humanen B-Zellen [YAMAOKA et al. 1994].

Um Effekte der 5-LO und ihrer Metabolite direkt nachzuweisen, wurden vergleichende Untersuchungen von 5-LO defizienten Mäusen und entsprechenden Kontrolltieren durchgeführt. Initiale Untersuchungen der Arbeitsgruppen um Chen und Koller zeigten keine erkennbaren Defekte in der Zusammensetzung der peripheren Blutpopulationen [GOULET et al. 1994] und Milz mit der Ausnahme, dass die Milzen der 5-LO defizienten Tiere kleiner sind [CHEN et al. 1994]. Bei diesen Untersuchungen wurden DZ jedoch nicht berücksichtigt.

LZ stellen mit etwa zwei bis vier Prozent nur eine zelluläre Minderheit in der Epidermis dar. Im Alter von acht Wochen beinhaltet ein Quadratmillimeter Ohrepiidermis einer C57BL/6J-Maus etwa 800 bis 900 LZ [BERGSTRESSER et al. 1980]. Diese DZ-Subpopulation proliferiert und differenziert unter pathogenfreien Bedingungen in der Epidermis [MERAD et al. 2002]. Hier kann ein möglicher Einfluss der 5-LO und ihrer Stoffwechselprodukte diskutiert werden, besonders da die Arbeitsgruppe um G. Randolph bei Mäusen mit Störungen u.a. im LT Stoffwechsel eine verminderte Anzahl von LZ in der Epidermis beobachtete [ROBBIANI et al. 2000].

In der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl und Verteilung der LZ in der Epidermis (Abb. 22) nachgewiesen werden. Auch die Anzahl der DZ in den subkutanen Lymphknoten oder der Milz von 5-LO-defizienten Tieren wiesen gegenüber den Kontrolltieren keinen signifikanten Unterschied auf (Abb. 23). Die Beobachtungen der Arbeitsgruppe um G. Randolph [ROBBIANI et al. 2000], dass 5-LO defiziente Tiere deutlich weniger LZ in der Ohrepiidermis aufweisen als die Kontrolltiere, konnte durch die eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden (siehe 4.3). Dabei ist jedoch zu bedenken, dass sowohl die Arbeitsgruppe um G. Randolph als auch die Arbeitsgruppe um X.S. Chen einen Hybrid-Mausstamm aus C57BL/6 und 129S Tieren verwendete, für den,

genetisch bedingt, nur annähernd adäquate Kontrolltiere zur Verfügung standen. Der Einfluss des genetischen Hintergrundes konnte auch durch die Arbeitsgruppe um J.L. Goulet belegt werden. Diese verglichen 5-LO defiziente Tiere verschiedener Mausstämmen und fanden große Unterschiede in den einzelnen immunologischen Reaktionen [GOULET et al. 1999]. Da diese Arbeitsgruppe ebenfalls keine Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung und Architektur der Lymphknoten und Milz sowie des peripheren Blutes fand [GOULET et al. 1994], deuten diese Daten darauf hin, dass die 5-LO unter physiologischen Bedingungen keinen nachweisbaren Effekt auf die Hämatopoese oder die Bildung der sekundären Lymphorgane hat.

Da die beiden Tierstämme in den untersuchten Merkmalen offenbar keine Unterschiede aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass die 5-LO in der normalen DZ-Biologie keine oder eine bisher unbekannte Funktion erfüllt.

5.3 Bedeutung der 5-LO bei der Migration von LZ in die peripheren Lymphknoten

Unter pathogenfreien Bedingungen konnten keine Unterschiede in der DZ-Biologie zwischen 5-LO defizienten Tieren und Wildtyp-Mäusen festgestellt werden. Hinweise aus der Literatur weisen jedoch darauf hin, dass LT, besonders die *cysLT* für einige pathologische Veränderungen in der Haut, z.B. bei der Entstehung von Psoriasis verantwortlich sein könnten [LEWIS et al. 1990]. Nach den Resultaten der vorliegenden Arbeit rücken für solche Beobachtungen die LZ in den Vordergrund, da diese 5-LO exprimieren und somit in der Lage sind LT zu produzieren. Welche der vielfältigen Funktionen der DZ, wie Antigenaufnahme und -präsentation oder die Migration und die T-Zellaktivierung, dabei von der 5-LO beeinflusst werden, ist noch weitgehend unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Migration der LZ ein 5-LO medierter Prozess ist. Nach der Kontaktsensibilisierung mit FITC beobachtete die Arbeitsgruppe um Robbiani eine deutlich verminderte Ansammlung von FITC-positiven DZ in den Lymphknoten von MRP1 defizienten Mäusen (u. a. Transportprotein für Cys-LT) [ROBBIANI et al. 2000]. LTC₄ beeinflusst offenbar die Signaltransduktion des Chemokinrezeptors CCR7 nach Bindung von CCL19 über die CysLT-Rezeptoren (Abb. 35). Von CCR7 ist bekannt, dass die Expression in LZ induziert wird, bevor

diese die Epidermis verlassen [YANAGIHARA et al. 1998 und SAEKI et al. 1999] und dieser Rezeptor ist erforderlich für die DZ Mobilisierung zu den Lymphknoten [FÖRSTER et al. 1999].

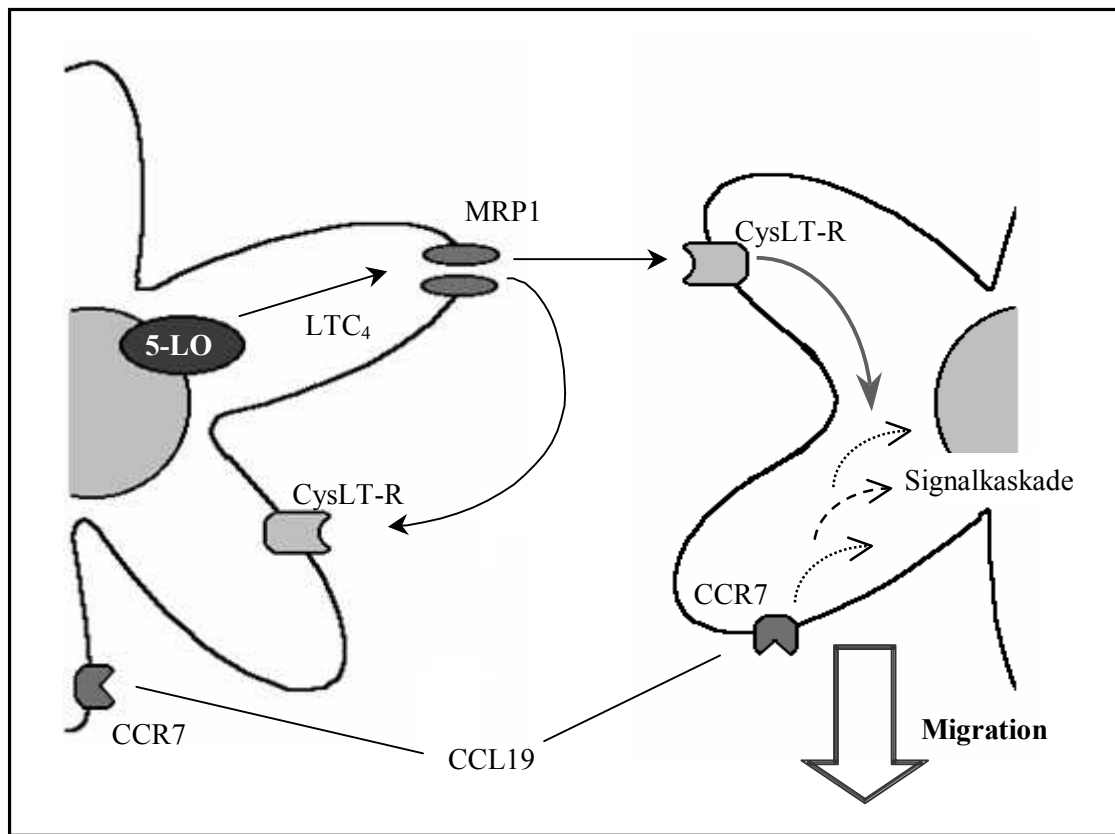


Abbildung 35: Indirekter Einfluß der 5-LO auf das Migrationsverhalten von LZ

LZ sind potenziell in der Lage über die 5-LO LTC₄ zu bilden. Dieses wird über das Transportprotein MRP1 aus der Zelle geschleust und wirkt über die CysLT-Rezeptoren autokrin und/oder parakrin auf andere DZ. LTC₄ beeinflusst die Signaltransduktion von CCR7 und ermöglicht so die Migration der LZ als Reaktion auf das Vorhandensein von CCL19 (auch MIP-3 β , macrophage inflammatory protein-3 β), einem Liganden von CCR7.

Neben LTC₄ werden auch zahlreiche andere Substanzen über MRP1 aus Zellen transferiert. Auch bei MRP1 Defizienz erfolgt ein Austritt geringer Mengen dieser Substanzen aus den Zellen und deutet somit auf eine mögliche zusätzliche Beteiligung anderer Mediatoren hin [WIJNHOLDS et al. 1997]. Um die Rolle der 5-LO während der Migration von LZ eindeutig zu identifizieren wurden daher Migrationsversuche unter Anwendung des Kontaktallergens FITC und Verwendung 5-LO defizienter Tieren und entsprechenden Kontrolltieren durchgeführt (siehe 3.7).

Die hier durchgeführten Analysen zeigen eindeutig eine funktionelle Rolle der 5-LO oder deren Stoffwechselprodukte bei der Migration von DZ und untermauern die Vermutung von Robbiani et al., dass LTC₄ hauptverantwortlich für die 75% reduzierte Migration der DZ in die peripheren Lymphknoten ist (Abb. 24).

Abgeschwächte Immunreaktionen unter Abwesenheit der 5-LO konnten bereits von anderen Arbeitsgruppen durch verminderte Immunantworten von 5-LO defizienten Tieren gezeigt werden. Bei der Induktion von Asthma durch Ovalalbumin zeigten 5-LO defiziente Mäuse signifikant weniger eosinophile Granulozyten in den Atemwegen und reduzierte Immunglobulinspiegel [IRVIN et al. 1997]. Die molekularen Mechanismen und die 5-LO exprimierenden Zellen blieben dabei unbekannt. Für diese Effekte können nur Granulozyten oder Lungenmakrophagen verantwortlich sein, da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die DZ der Atemwege keine 5-LO exprimieren.

Die abgeschwächten Reaktionen könnten einerseits auf die reduzierte Chemotaxis der Granulozyten und anderer Zellen, bedingt durch Mangel an LTB₄, und / oder auf einen verminderten Antigenkontakt der T-Zellen beruhen, wenn davon ausgegangen wird, dass bei den 5-LO defizienten Tieren wesentlich weniger aktivierte DZ den Lymphknoten erreichen. Eine verminderte Anzahl an aktivierten T-Zellen würde schließlich auch die B-Zell Biologie beeinflussen. Aber nicht nur in den lymphatischen Geweben sondern auch in der Peripherie macht sich der Einfluß von LT und damit von 5-LO auf die Immunreaktionen bemerkbar. Die Beobachtungen mehrerer Arbeitsgruppen, dass LTB₄ maßgeblich an der Rekrutierung von CD8 und CD4 Effektor-T-Zellen in die entzündeten Gewebe verantwortlich ist (Abb. 36) und somit die sekundären Immunreaktionen beeinflusst, unterstützen diese Sichtweise [GOODARZI et al. 2003, TAGER et al. 2003 und OTT et al. 2003]. Eine Unterdrückung dieser Immunantworten ist eine wichtige Voraussetzung für die Verträglichkeit von Transplantaten und bei der Behandlung von allergischen oder Autoimmunreaktionen und könnte einerseits direkt über die Inhibition der 5-LO oder andererseits auch über LT-Rezeptoren Antagonisten, z.B. für BLT₁R [MORITA et al. 1999], erfolgen. Der Einsatz der CysLT Antagonisten wie Montelukast und Zafirlukast (siehe auch 1.3.2) hat sich auch bei der Behandlung einer chronischen Hautentzündung, der atopischen Dermatitis (Neurodermitis), bewährt. Diese Krankheit tritt häufig bei Kindern und in Assoziation mit Asthma bronchiale auf [RACKAL & VENDER 2004].

Die B-Zellen der Maus können nur über einen parakrinen Weg von der 5-LO beeinflusst werden, da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass diese Zellen (Abb. 16) im Gegensatz zu den B-Zellen des Menschen [JAKOBSSON et al. 1992 und SPANBROEK et al. 2000] keine 5-LO exprimieren.

Das deutet an, dass die 5-LO im Menschen zumindest bezüglich der B-Zellen eine spezielle Funktion hat. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die B-Zellen in Maus und Mensch sehr ähnlich auf LT reagieren, nur dass im Laufe der Evolution die humanen B-Zellen die Fähigkeit erworben haben LT selbst herzustellen um schneller und effizienter auf gegebenen Immunreaktionen reagieren zu können.

5.4 Biologie der *in vitro* generierten DZ

Die DZ stellen im gesamten Organismus mit 1% in den lymphatischen Geweben und ca. 0,5% bis 4% in den peripheren Geweben nur eine zelluläre Minderheit dar. Deshalb ist für funktionelle Studien oder therapeutischen Einsatz immer eine Isolation und Anreicherung dieser Zellen notwendig. Eine andere Möglichkeit ist die Generierung von DZ aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks. Um große Mengen von DZ zu erhalten, wurde ein Kultursystem adaptiert, mit dem DZ *in vitro* generiert werden können. Bei dem hier verwendeten Kultursystem unter Verwendung von GM-CSF entwickeln sich nach 14-tägiger Kultivierung nicht-adhärenzte Zellen mit charakteristischen Merkmalen von DZ, wie die Expression von CD11c und MHC-II (Abb. 25).

Da bis auf LZ DZ *in vivo* keine 5-LO exprimieren, sollte ein Kulturmodell etabliert werden, mit dem man selektiv DZ und LZ generieren kann. Dieses steht dann für Untersuchungen der differenziellen 5-LO Expression zur Verfügung und ermöglicht funktionelle Studien. Aus der Literatur ist bekannt, dass TGF- β die Entwicklung von Langerhans-ähnlichen DZ unterstützt [ZHANG et al. 1999] und die 5-LO Expression in *in vitro* generierten humanen DZ [SPANBROEK et al. 2000] und MonoMac-6 Zellen [BRUNGS et al. 1995] steigert. Über den Einfluß von TGF- β auf die Reifung der Zellen sollte außerdem geklärt werden, ob 5-LO *in vitro* differenzierungsabhängig exprimiert wird.

Überraschender Weise exprimieren nahezu alle *in vitro* generierten DZ 5-LO (Abb. 29). Dies steht im Gegensatz zu den DZ *in vivo*, bei denen nur die LZ 5-LO exprimieren. Es besteht also

die Möglichkeit, dass die DZ der Maus generell dazu in der Lage sind 5-LO zu exprimieren, auch wenn es sich dabei nicht um LZ handelt. Ein möglicher Grund dafür könnte das umgebende Milieu sein, wie z.B. *in vivo* das Wechselspiel mit den Keratinozyten in der Epidermis oder *in vitro* die Zusammensetzung des Kulturmediums. Eine andere Möglichkeit ist, dass sich die Differenzierungswege der DZ *in vivo* und *in vitro* unterscheiden und *in vivo* der Schritt zur Expression der 5-LO nur von LZ durchgemacht wird. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die generierten DZ nur ein Kulturartefakt sind. Das heißt, dass diese Zellen Merkmale von LZ oder anderen DZ aufweisen, ohne wirklich die *in vivo* Korrelate zu sein. Dafür spricht, dass es bisher nicht gelang, CD8- α positive DZ *in vitro* zu generieren.

Außerdem könnte der Aspekt eine Rolle spielen, dass der Ursprung der LZ immer noch nicht eindeutig geklärt ist. Vielleicht haben LZ einen anderen hämatopoetischen Ursprung als andere DZ und deshalb die Fähigkeit 5-LO zu exprimieren. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Monozyten und DZ eine zeitlang gleich ist. Es konnte gezeigt werden, dass zwei Blutmonozyten-Subpopulationen frühe und reifere, *in vitro* zu DZ und Makrophagen differenzieren können [GEISSMANN et al. 2003]. Ebenfalls *in vitro* wurde gezeigt, dass DZ teilweise über einen monozytären Weg differenzieren [ZHANG et al. 1999]. Für das hier angewandte Kulturmodell könnte also die Möglichkeit bestehen, dass die Vorläuferzellen 5-LO exprimieren und die Expression auch dann fortsetzen, wenn sie zu DZ differenzieren.

Ohne TGF- β wurden bei den hier durchgeführten Experimenten CD11b positive DZ generiert. Unter dem Einfluss von TGF- β entstehen Langerhans-ähnliche DZ, die CD11b negativ sind. Dieser Sachverhalt verdeutlicht, dass sich *in vitro* generierte Zellen häufig von ihrem *in vivo* Pendant unterscheiden, da LZ in der Haut CD11b exprimieren [MERAD et al. 2000], die Langerhans-ähnlichen DZ in der Kultur jedoch nicht.

Bisher wurden Kultursysteme beschrieben, in denen isolierte Stammzellen eingesetzt wurden [INABA et al. 1992]. In der vorliegenden Arbeit wurde das Kultursystem nach Lutz et al., der das gesamte Knochenmark einsetzt [LUTZ et al. 1999], erstmals durch Zugabe von TGF- β modifiziert. Möglicherweise fördert TGF- β die Differenzierung einer speziellen Subpopulation besonders unter dem Einfluß von anderen Zellen, die noch in der Knochenmarkssuspension vorhanden sind.

Beide Kulturvarianten führten zu 5-LO positiven DZ, so dass der erhoffte Effekt von TGF- β auf die 5-LO Expression nicht gezeigt werden konnte.

Die bisher beschriebenen Ergebnisse, mit Ausnahme der 5-LO Expression, sind für 5-LO defiziente Mäuse und Wildtyp-Mäuse identisch und werden daher nicht getrennt diskutiert.

Durch den Vergleich der DZ *in vivo* mit den DZ *in vitro* ergibt sich folgender Befund: Im Gegensatz zu DZ *in vivo*, außer LZ, exprimieren *in vitro* differenzierte DZ 5-LO.

Für zukünftige Untersuchungen muss daher berücksichtigt werden, dass sich die *in vitro* generierten DZ von den DZ *in vivo* hinsichtlich der 5-LO Expression unterscheiden und einzelne Effekte eventuell auf die Anwesenheit (*in vitro*) oder die Abwesenheit (*in vivo*) der 5-LO zurückzuführen sind. Hier ist besonders die Migration der DZ zu erwähnen, da gezeigt werden konnte, dass humane DZ in Kultur mit IL-4 die 5-LO Expression runterregulieren und dann eine Verschlechterung der Migration dieser Zellen zu beobachten ist [SPANBROEK et al. 2001 und THURNHER et al. 2001]. Ein Einfluss der 5-LO auf die Migrationsfähigkeit von DZ konnte ebenfalls in MRP1 defizienten Mäusen gezeigt werden, da die Zugabe von exogenem LTC₄ hier eine Verbesserung der Migration hervorrief [ROBBIANI et al. 2000].

Die *in vitro* generierten DZ eignen sich einerseits sehr gut für funktionelle Studien der 5-LO, da hier 5-LO positive DZ unterschiedlicher Reifegrade und Merkmale erzeugt werden können. Andererseits weisen die *in vitro* generierten DZ zu viele Unterschiede zu den *in vivo* DZ auf, um die tatsächlichen Reaktionen der LZ innerhalb der Haut erklären zu können, da z.B. auch die Migration ein multifaktorieller Prozess ist, der über viele Variablen gesteuert wird.

5.5 Lokalisation der 5-LO in LZ und *in vitro* generierten DZ

Um die biologische Bedeutung von LT produzierenden Zellen zu untersuchen, ist es notwendig die Umstände zu identifizieren, die zu einer LT Synthese führen. Da LT schon in sehr geringen Konzentrationen hoch potent wirken aber teilweise schon nach wenigen Minuten zerfallen oder weiter verstoffwechselt werden, ist der *in vivo* Nachweis nur schwer möglich. Die einzige Möglichkeit, die zurzeit besteht, LT nachzuweisen, ist die Aufarbeitung ganzer Gewebefragmente mit anschließendem Nachweis durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) oder Radioimmunoassay-Analysen (RIA). Durch diese Untersuchungen gehen jedoch die Informationen über die zelluläre Quelle der LT verloren.

Die Isolation spezieller Zellpopulationen, wie im Falle der vorliegenden Arbeit der LZ, führt zu einer Aktivierung der Zellen und möglicherweise ebenfalls zu einer Aktivierung der 5-LO, so dass spezifische Induktoren der LT-Synthese nicht identifiziert werden können. Eine Möglichkeit die Aktivierung der 5-LO *in vivo* nachzuweisen, ist die intrazelluläre Darstellung der 5-LO mit Hilfe der konfokalen Laserscanningmikroskopie.

Unter pathogenfreien Bedingungen konnte die 5-LO in den LZ der Epidermis im gesamten Zellkörper nachgewiesen werden (Abb. 30, A bis D). Die Migration durch die Dermis in die Lymphknoten führt zu einer kernständigen Konzentration des Enzyms Abb. 30, E bis H). Während der Zellaktivierung durch einen Stimulus wird eine Translokation der 5-LO erkennbar. Dieser Vorgang wurde bereits für andere Zellen beschrieben [BROCK et al. 1994 und PETERS-GOLDEN 1998] und konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden (siehe 4.5.1). Nach der FITC-Behandlung ändert sich die Lokalisation der 5-LO in den LZ bereits in der Epidermis und konzentriert sich dann auf den Kern (Abb. 30, I bis L). Da in zellulären Systemen die Translokation der 5-LO der initiale Schritt zur LT-Biosynthese ist, kann angenommen werden, dass die Induktion der Migration mit einer Aktivierung der 5-LO bzw. Produktion von LT oder umgekehrt einhergeht. Unterstützend zu den *in vivo* Daten konnte eine Translokation der 5-LO nach LPS-Aktivierung *in vitro* nur in ausgereiften Zellen nachgewiesen werden (Abb. 31, A und B). Allerdings zeigten sich Unterschiede in der Verteilung der 5-LO. Während es bei den LZ *in vivo* zur Translokation der 5-LO vom Zytosol zum Kern kommt, ist bei den *in vitro* differenzierten DZ die 5-LO nie im Zytosol nachweisbar und nur der nukleäre Pool an 5-LO transloziert an die Kernmembran. Eosinophile Granulozyten zeigen aufgrund äußerer Stimuli eine zweistufige Translokation: erst vom Zytosol in den Kern und dann an die Kernmembran [BROCK et al. 1999]. Diese Beobachtung ist vergleichbar mit dem Verhalten der LZ. In den Langerhans-ähnlichen mit TGF- β kultivierten, unreifen DZ konnte keine Translokation der 5-LO nachgewiesen werden (Abb. 31, C und D), da diese Zellen noch nicht in der Lage sind auf aktivierende Reize zu reagieren. Da die Translokation der 5-LO mit der LT-Biosynthese assoziiert werden kann, ergeben die gewonnenen Ergebnisse folgendes Bild: In unreifen, ruhenden LZ liegt die 5-LO als inaktives Protein vor. Nach einer Aktivierung der LZ in der Epidermis und während der Migration der LZ durch die Dermis in die subkutanen Lymphknoten unter physiologischen und

pathophysiologischen Bedingungen kommt es zur Translokation der 5-LO und somit zur möglichen LT-Synthese.

In den meisten Geweben der Maus finden sich neben den 5-LO negativen DZ 5-LO exprimierende Zellen wie Makrophagen oder Granulozyten, die mit der LT-Synthese die Funktionen der DZ und die Immunreaktionen in diesen Bereichen beeinflussen können. Nur innerhalb der Epidermis fehlen derartige 5-LO exprimierenden Zellen. Hier treten dann die LZ als einzige 5-LO exprimierende Zellen in Erscheinung, da das Protein für die Immunreaktionen auch in der Epidermis von essentieller Bedeutung ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten an, dass eine Translokation und Aktivierung der 5-LO unter pathologischen Bedingungen bereits am Ausgangsort der Migration, der Epidermis stattfinden kann (Abb. 30, I bis L). Es besteht also die Möglichkeit, dass die Leukotrienbiosynthese bereits in der Epidermis gestartet wird. In einer kürzlich erschienenen Publikation [KISSENPFENNIG et al. 2005] wurde nachgewiesen, dass LZ und dermale DZ ein unterschiedliches Migrationsverhalten, nach Sensibilisierung, in die peripheren Lymphknoten aufweisen. Während das Maximum an eingewanderten dermalen DZ schon nach zwei Tagen beobachtet wurde, wurde das Maximum an LZ erst nach vier Tagen erreicht. Die Autoren konnten zeigen, dass LZ nach Aktivierung durch mechanischen Stress zunächst einige Zeit (ca. 16-24 Stunden) in der Epidermis verbleiben, ehe sie in die peripheren Lymphorgane auswandern. Diese Verzögerung wurde hauptsächlich darauf zurückgeführt, dass LZ einige Zeit benötigen, um sich aus dem epidermalen Gewebeverband herauszulösen. Während dieser Zeit könnten aktivierte LZ bedeutende Mengen an LT produzieren, die parakrin zunächst die Migration dermalen DZ initiieren und später dann autokrin die eigene Migration.

Die Art der LT spielt dabei eine entscheidende Rolle. Während LTC₄ durch die Modulation des durch CCL19 hervorgerufenen Signaltransduktionsweges, die Migration der LZ mediert [ROBBIANI et al. 2000], lockt LTB₄ Effektor-T-Zellen an den Ort des Geschehens [GOODARZI et al. 2003, TAGER et al. 2003 und OTT et al. 2003] (Abb. 35 und 36). Die Möglichkeit der Bildung von LTB₄ in der Epidermis ist einerseits durch die 5-LO positiven LZ und andererseits über einen transzellulären Mechanismus durch die Keratinozyten gegeben (Abb. 36), da diese über LTA₄-Hydrolase verfügen und bereitgestelltes LTA₄ verstoffwechseln können [IVERSEN et al. 1997]. Cys-LT wirken auf die Permeabilität von Gefäßen [BRINK et

al.2003]. Dies geschieht wahrscheinlich über den CysLT₂-R, da gezeigt werden konnte, das HUVEC diesen Rezeptor prädominant exprimieren [LÖTZER et al. 2003].

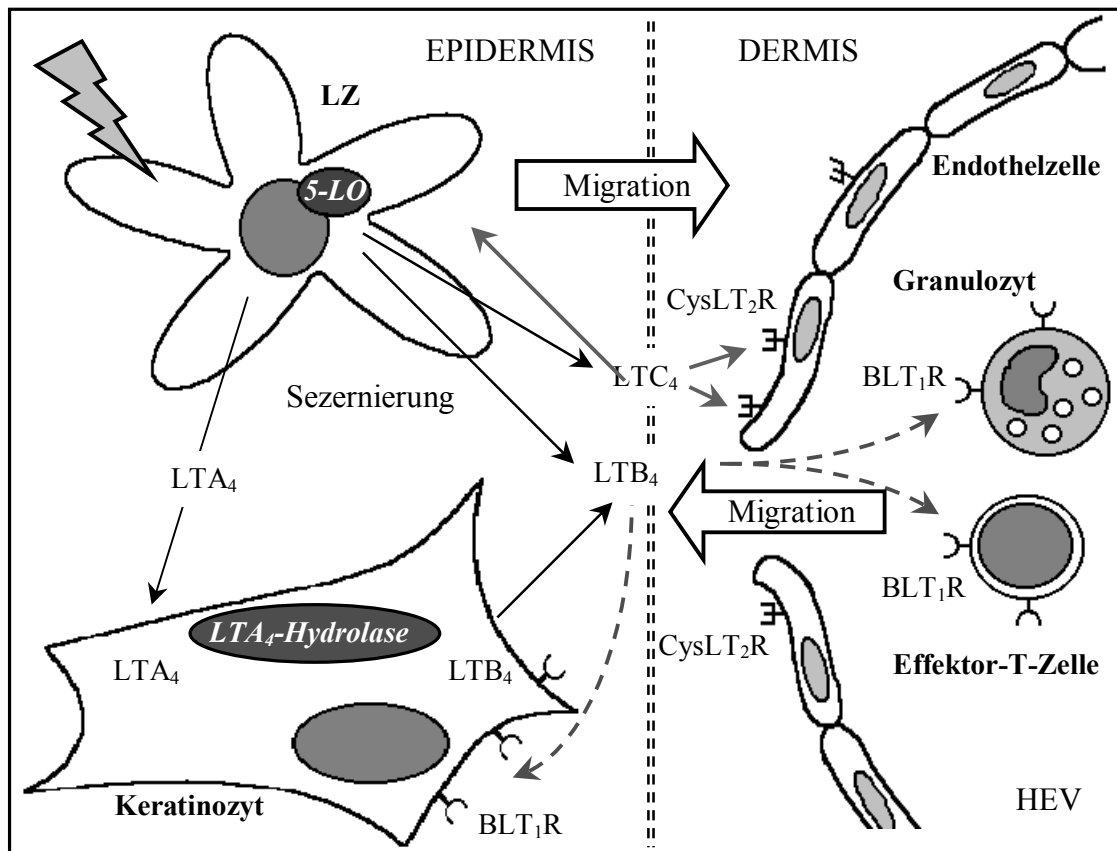


Abbildung 36: Initiale Schritte in der Entzündung der Haut

Durch einen exogenen Stimulus kommt es zur Aktivierung der LZ und somit zur LT-Biosynthese. Die Sezernierung von LTB₄ führt zur Rekrutierung von BLT₁R positiven Effektor-T-Zellen und / oder Granulozyten. Ebenfalls sezerniertes LTC₄ steigert die Permeabilität der High Endothelial Venoules (HEV) und induziert die Migration von LZ (Details, siehe Abb. 35).

Der Effekt der LTB₄-Ausschüttung kann über einen transzellulären Mechanismus durch die Keratinozyten verstärkt werden.

5.6 Expression funktioneller LT-Rezeptoren in *in vitro* differenzierten DZ

Nachdem 5-LO positive LZ und die Translokation des Proteins während der Migration gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob LZ oder andere DZ auf LT reagieren können und welche LT-Rezeptoren sie exprimieren. Daraus ergibt sich auch die Frage nach einer autokrinen und / oder parakrinen Beeinflussung der DZ, einer möglichen differentiellen Expression der Rezeptoren und dadurch Rückschlüsse auf die Funktion der 5-LO und ihrer Stoffwechselprodukte.

Nachdem der Proteinnachweis der 5-LO durch die indirekte Immunfluoreszenzanalysen in den generierten DZ keinen deutlichen Unterschied zeigte, wurden die beiden Kultursysteme auf mRNA Ebene hinsichtlich der anderen Konstituenten des 5-LO Stoffwechselwegs untersucht. Alle untersuchten Konstituenten des 5-LO Stoffwechselwegs konnten in unterschiedlichen Mengen in den *in vitro* generierten DZ nachgewiesen werden (siehe 4.5.2). Durch diese Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass TGF- β einen entscheidenden Einfluss auf die LT-Rezeptor Expression ausübt. Zugabe von TGF- β reduzierte die Expression der Rezeptoren und FLAP auf mRNA Ebene. Wobei das Ausmaß der Reduktion und die relative Menge der Transkripte stark variieren. TGF- β reduziert die Expression des BLT₁R um ein Siebenfaches und die des CysLT₁R und FLAP um ca. die Hälfte (Abb. 32).

TGF- β inhibiert die terminale Differenzierung von DZ und damit möglicherweise auch die Expression von LT-Rezeptoren, da unreife DZ die Rezeptoren möglicherweise funktionell noch nicht benötigen. Außerdem könnte durch TGF- β die Differenzierung einer spezifischen Subpopulation von DZ gefördert werden, welche die Rezeptoren nicht oder nur in geringen Mengen exprimiert. Die RT-PCR Analysen epidermaler Proben zeigten ähnlich hohe Expressionswerte für FLAP und den LT-Rezeptoren, während die *in vitro* generierten DZ eine ca. vierzigfach stärkere Expression von FLAP gegenüber den LT-Rezeptoren aufwiesen. Zusätzlich zu diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Expression von FLAP in den Epidermisproben um etwa den Faktor Acht gegenüber den *in vitro* DZ reduziert ist.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *in vitro* generierte DZ ein anderes Expressionsprofil der Konstituenten des 5-LO Stoffwechselwegs aufweisen als LZ *in vivo*. Vergleichende Untersuchungen von isolierten humanen LZ und davon abgereicherte Keratinozyten zeigten jedoch, dass nicht nur LZ alle Konstituenten des 5-LO Stoffwechselwegs exprimieren

[SPANBROEK et al. 1998]. Eher wahrscheinlich ist es davon auszugehen, dass 5-LO und FLAP lediglich von LZ exprimiert werden, die LT-Rezeptoren jedoch auch von anderen Zellen der Epidermis wie Keratinozyten und / oder epidermale T-Zellen, wie schon für den BLT₁R in Keratinozyten der humanen Epidermis gezeigt werden konnte [REUSCH & WASTEK 1989]. Zukünftige Untersuchungen von isolierten Keratinozyten und epidermalen T-Zellen können dabei helfen aufzuklären, ob diese Zellpopulationen LT-Rezeptoren exprimieren und wie sie auf Stimulation mit LT reagieren.

Die RT-PCR Analysen der *in vitro* generierten DZ zeigten Unterschiede in der Rezeptorexpression in Abhängigkeit von TGF- β . Diese Unterschiede konnten durch funktionelle Studien mit Kalzium-Messungen bestätigt werden (siehe 4.5.3). Eine Signalinduktion durch LTD₄ und LTB₄ konnte nur in den DZ ohne den Zusatz von TGF- β nachgewiesen werden (Abb. 34). Reife DZ exprimieren also funktionelle BLT₁R und CysLT₁R. Die unreifen DZ im Kultursystem mit TGF- β exprimieren diese Rezeptoren nicht oder nur in geringen Mengen und können dadurch nicht adäquat auf die Leukotriene über den hier untersuchten Signalweg reagieren.

Die stark verminderte Induktion der Reifung sowie Translokation der 5-LO an die Kernmembran, induziert durch LPS, im Zusammenhang mit der stark verminderten Expression der LT-Rezeptor und FLAP mRNA in TGF- β behandelten Kulturen, deuten auf eine differenzierungsabhängige Expression der 5-LO Stoffwechselkonstituenten in DZ hin. Der Differenzierungsgrad von DZ lässt sich nach heutigen Erkenntnissen in mehrere Stadien einteilen. DZ Vorläuferzellen des Blutes sind unreife Zellen, die CD11c aber kein MHC-II exprimieren. Nach Eintritt in die peripheren Gewebe unter physiologischen Bedingungen reifen diese Zellen und exprimieren verstärkt MHC-II Moleküle. Nach Aktivierung und Migration in die Lymphknoten werden kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 gesteigert exprimiert. Dieser komplexe Reifungs- und Aktivierungsmechanismus könnte sich durchaus auch in dem Expressionsprofil der 5-LO Konstituenten widerspiegeln. Frühe oder unreife DZ exprimieren keine oder nur geringe Mengen an LT-Rezeptor mRNA, da sie in diesem Stadium noch nicht die Voraussetzungen erfüllen, um aus den peripheren Gewebe auszuwandern und deshalb auch die entsprechenden Rezeptoren nicht benötigt werden. Erreichen DZ ein bestimmtes Reifungsstadium werden vermehrt LT-Rezeptoren exprimiert, so dass diese Zellen nach Aktivierung durch exogene Stimuli unmittelbar auf sezernierte LT

reagieren können. Dies wird auch durch die differenzierungsabhängige Translokation der 5-LO in reifen DZ unterstützt.

5.7 Einfluss der 5-LO auf die Langerhans-Zellen

Zusammenfassend mit bereits gewonnenen Erkenntnissen und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kristallisiert sich mehr und mehr eine Sonderstellung der LZ im System der DZ heraus. LZ verbleiben im Gegensatz zu den anderen DZ sehr lange in der Peripherie. Unter pathogenfreien Bedingungen konnte eine mittlere Lebenserwartung von 15 Tagen gezeigt werden [HOLT et al. 1994]. Eine Besonderheit der LZ ist außerdem ihrer Lage in der obersten Epithelschicht der Haut, wo sonst keine 5-LO exprimierenden Zellen vorkommen. Alle anderen DZ-Subpopulationen befinden sich unterhalb des Epithels in direkter Nachbarschaft von 5-LO positiven Granulozyten oder Makrophagen.

Außerdem wird diskutiert, dass LZ eigene Vorläuferzellen besitzen und unter pathogenfreien Bedingungen und moderaten inflammatorischen Bedingungen Verluste durch Teilung und nicht durch Rekrutierung von Vorläuferzellen aus dem Blut ausgleichen [MERAD et al. 2002]. Daher ist die Tatsache, dass nur die LZ in der Maus als einzige DZ-Population 5-LO exprimieren, möglicherweise ein weiteres Charakteristikum der Sonderstellung dieser speziellen Zellgruppe des Immunsystems.

DZ wandern konstitutiv auch ohne äußeren Stimulus aus der Peripherie in die sekundären Lymphorgane aus [TURNBULL & MACPHERSON 2001]. In diesem Fall nehmen sie kein Fremdartigen auf, sondern präsentieren körpereigene Peptide [HUANG et al. 2000]. Dabei verbleiben sie in einem unreifen oder teilaktiven Stadium [MAHNKE et al. 2002]. Eine Art der Differenzierung durchlaufen jedoch auch diese Zellen, da die Selbstantigene auch durch gesteigerte MHC-Expression präsentiert werden, aber die Menge der kostimulatorischen Moleküle wie CD40 und CD80 niedrig sind oder fehlen. Dies gilt auch für die LZ der Haut [HEMMI et al. 2001]. Durch die Präsentation körpereigener Proteine wird eine Toleranz induziert, wie bereits für unreife DZ im Humansystem [DHODAPKAR et al. 2001] und in der Maus [LUTZ et al. 2000] beschrieben.

5-LO defiziente Mäuse zeigen eine veränderte, abgeschwächte Immunreaktion z.B. bei Atemwegserkrankungen [IRVIN et al. 1997]. Als verantwortlich für diese Effekte werden dabei

Zellen diskutiert, von denen bekannt ist, dass diese 5-LO exprimieren, die eosinophilen Granulozyten.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass 5-LO defiziente Mäuse Migrationsdefizite der LZ aufweisen und es kann davon ausgegangen werden, dass dies ebenfalls zu abgeschwächten Immunreaktionen führt. Diese Ergebnisse unterstreichen die essentielle Rolle der 5-LO für die Induktion von Immunreaktionen und besonders für LZ in der epidermalen Immunologie.

Die unterschiedliche Expression der 5-LO und ihrer Konstituenten in Abhängigkeit vom Zelltyp in der Maus im Gegensatz zum Menschen deuten auf unterschiedliche oder zusätzliche Funktionen hin. Am Modellsystem der Maus können also nicht alle Aspekte der 5-LO vermittelten Stoffwechselreaktionen untersucht werden. Zumindest sollten immunologische Funktionen von LZ hinsichtlich der 5-LO bzw. LT untersucht werden können.

6. Zusammenfassung

Die Bezeichnung DZ beschreibt eine heterogene Gruppe von APZ, die in lymphatischen Geweben (Lymphknoten, Milz und Thymus und nicht-lymphatischen Geweben (Haut und Schleimhäute) zu finden sind.

Die Hauptfunktionen der DZ sind Antigenaufnahme, Antigenprozessierung und schließlich Antigenpräsentation für antigenspezifische T-Zellen in Assoziation mit MHC-I oder MHC-II. Die resultierende Immunantwort ist abhängig vom entsprechenden Antigen, dem Eintrittsort des Antigens, dem Differenzierungsstadium und Subtyp der DZ.

In der Maus konnten bisher sechs verschieden DZ Subpopulationen unterschieden werden. Grob werden sie in myeloische, lymphatische und plasmazytoide DZ unterteilt und über verschiedene Oberflächenmoleküle wie CD4, CD8- α und CD11b charakterisiert.

Die 5-LO und deren Stoffwechselprodukte spielen sowohl in der zellulären als auch in der humoralen Immunität eine wichtige Rolle. Dabei beeinflussen sie besonders die Initiation und die ersten Schritte der Immunreaktionskaskade, die durch die Antigenpräsentation der DZ gestartet werden.

Aufgrund der Daten über die Expression der 5-LO in humanen DZ wurden die Untersuchungen auf das Modellsystem Maus erweitert. Wie in der humanen Epidermis exprimieren auch die LZ der Maus 5-LO.

Immunhistologische Untersuchungen der lymphatischen Organe, der Darmwand und der Atemwege der Maus zeigten, dass die untersuchten DZ 5-LO negativ sind. Eine Ausnahme bildet eine kleine Population in den subkutanen Lymphknoten, welche aus der Haut zu stammen scheint und bezüglich ihrer Oberflächenmoleküle als LZ eingeordnet werden können.

Vergleichende Untersuchungen von 5-LO defizienten Mäusen und entsprechenden Kontrolltieren mit genetischem C57BL/6J Hintergrund sollten zeigen, ob die 5-LO neben ihrer bekannten Funktion bei immunologisch-allergischen Reaktionen auch eine funktionelle Bedeutung in der normalen LZ-Biologie in der Epidermis, z.B. bei der Proliferation und Differenzierung, hat. Während unbehandelte Tiere beider Stämme keine Unterschiede in der Anzahl der DZ aufweisen, konnte nach der Behandlung der Haut mit einem Kontaktallergen

eine um 75% verminderte DZ-Migration von der Haut in die regionalen Lymphknoten beobachtet werden.

Um einen Einfluss der 5-LO auf die Differenzierung von DZ zu untersuchen, wurde *in vitro* Generation von DZ aus Knochenmarkszellen durchgeführt. Die Kultursysteme wurden mit GM-CSF und unter An- oder Abwesenheit von TGF- β inkubiert, um verschiedene DZ-Subpopulationen zu erzeugen.

TGF- β wirkt als Induktor der 5-LO, wie in anderen Kultursystem bereits gezeigt werden konnte. Überraschender Weise exprimieren alle *in vitro* generierten DZ der Maus 5-LO und zwar unabhängig von TGF- β .

Unter dem Einfluss von TGF- β wurden Langerhans-ähnliche DZ generiert, die jedoch im Gegensatz zu ihrem *in vivo* Pendant kein CD11b auf ihrer Oberflächen tragen.

TGF- β hat einen inhibitorischen Einfluss auf die Differenzierung der *in vitro* generierten DZ. Ohne das Zytokin konnte die Expression von MHC-II und der kostimulatorischen Moleküle nach einer Aktivierung durch LPS gesteigert werden, was einer DZ-Reifung entspricht. Unter Einfluss von TGF- β konnte diese Änderung mittels Durchflusszytometrie nicht dokumentiert werden. Neben den Oberflächenmolekülen sind auch die Konstituenten des 5-LO Stoffwechselweges vom Differenzierungsstadium der DZ abhängig. RT-PCR Analysen zeigten nur eine verminderte Expression von BLT₁-R und CysLT₁-R in den *in vitro* generierten DZ unter dem Einfluss von TGF- β . Kalzium-Messungen unterstützen diese Resultate.

Diese Daten und Hinweise aus der Literatur festigen die Hypothese, dass LZ eine Sonderstellung im System der APZ in Immunsystem einnehmen.

7. Literatur

- Adler AJ, Marsh DW, Yochum GS, Guzzo JL, Nigam A, Nelson WG and Pardoll DM (1988): CD4+T Cell Tolerance to Parenchymal Self-Antigens Requires Presentation by Bone Marrow-derived Antigen-presenting Cells.
Journal Experimental Medicine 187: 1555–1564
- Albert ML, Sauter B and Bhardwaj N (1998): Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs.
Nature 392: 86-89
- Anderson ME, Allison RD and Meister A (1982): Interconversion of leukotrienes catalyzed by purified gamma-glutamyl transpeptidase: concomitant formation of leukotriene D₄ and gamma-glutamyl amino acids.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 79:1088-1091
- Anthonsen MW, Andersen S, Solhaug A and Johansen B (2001): Atypical λ / ι PKC Conveys 5-Lipoxygenase/Leukotriene B₄-mediated Cross-talk between Phospholipase A₂s Regulating NF- κ B Activation in Response to Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 β .
Journal of Biological Chemistry 276: 35344–35351
- Anjuere F, Martin P, Ferrero I, Lopez Fraga M, Del Hoyo GM, Wright N and Ardavin C (1999): Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse.
Blood 93: 590-598
- Apostolopoulos V and McKenzie IF (2001): Role of the mannose receptor in the immune response.
Current Molecular Medicine 1: 469-474
- Ardavin D, Wu L, Li CL and Shortman K (1993): Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population.
Nature 362: 761-763
- Ardavin C (1997): Thymic dendritic cells.
Immunology Today 18:350-361
- Ardavin C, Del Hoyo GM, Martin P, Anjuere F, Arias CF, Marin AR, Ruiz S, Parrillas V and Hernandez H (2001): Origin and differentiation of dendritic cells.
Trends in Immunology 22: 691-700
- Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, Vicari A, O'Garra A, Biron C, Briere F and Trinchieri G (2001): Mouse type I IFN-producing cells are immature APC with plasmacytoid morphology.
Nature Immunology 2: 1144-1150

- Banchereau J and Steinman RM (1998): Dendritic cells and the control of immunity.
Nature 392: 245-252
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B and Palucka K (2000): Immunobiology of dendritic cells.
Annual Review of Immunology 18: 767-811
- Baumann I, Kolowos W, Voll RE, Manger B, Gaipf U, Neuhuber WL, Kirchner T, Kalden JR and Herrmann M (2002): Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus.
Arthritis and Rheumatism 46: 191-201
- Bergstresser PR, Fletcher CR and Streilein JW (1980): Surface densities of Langerhans cells in relation to rodent epidermal sites with special immunologic properties.
Journal of Investigative Dermatology 74: 77-80
- Birbeck M, Breathnach A, Everall J (1961): An electron microscopy study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo.
Journal of Investigative Dermatology 37: 51-63
- Borgeat P, Hamberg M and Samuelsson B (1976): Transformation of arachidonic acid and homo-gamma-linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes monohydroxy acids from novel lipoxygenases.
Journal of Biological Chemistry 251: 7816-7820
- Borgeat P and Samuelsson B (1979): Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: effects of ionophore A23187.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 76: 2148-2152
- Brach MA, de Vos S, Arnold C, Gruss HJ, Mertelsmann R and Herrmann F (1992): Leukotriene B₄ transcriptionally activates interleukin-6 expression involving NF- κ B and NF-IL6.
European Journal of Immunology 22: 2705-2711
- Brash AR (1999): Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate.
Journal of Biological Chemistry 274: 23679-23682
- Brink C, Dahlén SE, Drazen J, Evans JF, Hay DW, Nicosia S, Serhan CN, Shimizu T, Yokomizo T (2003): International Union of Pharmacology XXXVII Nomenclature for Leukotriene and Lipoxin Receptors.
Pharmacological Reviews 55: 195-227
- Brock TG, Paine R III and Peters-Golden M (1994): Localization of 5-lipoxygenase to the nucleus of unstimulated rat basophilic leukemia cells.
Journal of Biological Chemistry 269: 22059-22066

- Brooks CD and Summers JB (1996): Modulators of leukotriene biosynthesis and receptor activation.
Journal of Medicinal Chemistry 39: 2629-2654
- Brungs M, Rådmark O, Samuelsson B and Steinhilber D (1995): Sequential induction of 5-lipoxygenase gene expression and activity in Mono Mac 6 cells by transforming growth factor-beta and 1,25-dihydroxyvitamin D₃.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92: 107-111
- Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumara K, Lanier LL and Banchereau J (1994): B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells.
Journal of Experimental Medicine 180: 1841-1847
- Caux C, Ait-Yahia S, Chemin K, de Bouteiller O, Dieu-Nosjean MC, Homey B, Massacrier C, Vanbervliet B, Zlotnik A and Vicari A (2000): Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines.
Springer Seminar of Immunopathology 22: 345-69
- Cavanagh LL and von Andrian UH (2002): Travellers in many guises: The origins and destinations of dendritic cells.
Immunology and Cell Biology 80: 448-462
- Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A and Colonna M (1999): Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon.
Nature Medicine 5: 919-923
- Chen XS, Sheller JR, Johnson EN and Funk CD (1994): Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene.
Nature 372: 179-182
- Chen XS, Naumann TA, Kurre U, Jenkins NA, Copeland NG and Funk CD (1995): cDNA cloning, expression, mutagenesis, intracellular localization, and gene chromosomal assignment of mouse 5-lipoxygenase.
Journal of Biological Chemistry 270: 17993-17999
- Claesson HE and Dahlen SE (1999): Asthma and leukotrienes: antileukotrienes as novel anti-asthmatic drugs.
Journal of Internal Medicine 245: 205-227
- Cumberbatch M and Kimber I (1990): Phenotypic characteristics of antigen-bearing cells in the draining lymph nodes of contact sensitized mice.
Immunology 71: 404-410

- De Becker G, Moulin V, Tielemans F, De Mattia F, Urbain J, Leo O and Moser M (1998): Regulation of T helper cell differentiation in vivo by soluble and membrane proteins provided by antigen-presenting cells.
European Journal of Immunology 28: 3161-3171
- De Smedt T, Pajak P, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, Urbain J, Leo O and Moser M (1996): Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo.
Journal of Experimental Medicine 184: 1413-1424
- Del Hoyo GM, Martin P, Hernandez Vargas H, Ruiz S, Fernandez A and Ardavin C (2002): Characterization of a common precursor population for dendritic cells.
Nature 415: 1043-1047
- Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C and Bhardwaj N (2001): Antigen specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells.
Journal of Experimental Medicine 193: 233-238
- Dupasquier M, Stoitzner P, van Oudenaren A, Romani N and Leenen PJM (2004): Macrophages and dendritic cells constitute a major subpopulation of cells in the mouse dermis.
Journal of Investigative Dermatology 123: 876-879
- Fels AO, Pawlowski NA, Cramer EB, King TK, Cohn ZA and Scott WA (1982): Human alveolar macrophages produce leukotriene B₄.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 79:7866-7870
- Figuerola DJ, Breyer RM, Defoe SK, Kargman S, Daugherty BL, Waldburger K, Liu Q, Clements M, Zeng Z, O'Neill GP, Jones TR, Lynch KR, Austin CP and Evans JF (2001): Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in normal human lung and peripheral blood leukocytes.
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 163: 226-233
- Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJ (1980): Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes.
Nature 286: 264-265
- Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E and Lipp M (1999): CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs.
Cell 99: 23-33
- Freudenthal PS and Steinman RM (1990): The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 87: 7698-7705

- Funk CD, Chen XS, Tu YP, Sheller JR and Irvin CG (1998): The role of 5-lipoxygenase products in a mouse model of allergic airway inflammation.
In: Eicosanoids, Aspirin and Asthma. Marcel Dekker, New York: 187-200
- Gladue RP, Carrol LA, Milici AJ, Scampoli DN, Stukenbrok HA, Pettipher ER, Salter ED, Contillo L and Showell HJ (1996): Inhibition of leukotriene B₄-receptor interaction suppresses eosinophil infiltration and disease pathology in a murine model of experimental allergic encephalomyelitis.
Journal of Experimental Medicine 183: 1893-1898
- Geissmann F, Jung S and Littman DR (2003): Blood monocytes consists of two principal subsets with distinct migratory properties.
Immunity 19: 2-4
- Goordarzi K, Goordarzi M, Tager AM, Luster AD and von Adrian UH (2003): Leukotriene B₄ and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues.
Nature Immunology 4: 965-973
- Goulet JL, Snouwaert JN, Latour AM, Coffman TM and Koller BH (1994): Altered inflammatory responses in leukotriene-deficient mice.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 91: 12852-12856
- Goulet JL, Griffiths RC, Ruiz P, Spurney RF, Pisetsky DS, Koller BH and Coffman TM (1999): Deficiency of 5-Lipoxygenase Abolishes Sex-Related Survival Differences in MRL-lpr/lpr Mice.
Journal of Immunology 163: 359-366
- Griffiths RJ, Smith MA, Roach ML, Stock JL, Stam EJ, Milici AJ, Scampoli DN, Eskra JD, Byrum RS, Koller BH and McNeish JD (1997): Collagen-induced arthritis is reduced in 5-lipoxygenase-activating protein-deficient mice.
Journal of Experimental Medicine 185: 1123-1129
- Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J and Liu YJ (1997): The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand.
Journal of Experimental Medicine 185:1101-1111
- Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien RY (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties.
Journal of Biological Chemistry 260: 3440-3450
- Hamberg M and Samuelsson B (1974): Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 71: 3400-3404

- Heise CE, O'Dowd BF, Figueroa DJ, Sawyer N, Nguyen T, Im DS, Stocco R, Bellefeuille JN, Abramovitz M, Cheng R, Williams DL, Zeng Z, Liu Q, Ma L, Clements MK, Coulombe N, Liu Y, Austin CP, George SR, O'Neill GP, Metters KM, Lynch KR and Evans JF (2000): Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor.
Journal of Biological Chemistry 275(39): 30531-30536
- Hemmi H, Yoshino M, Yamazaki H, Naito M, Iyoda T, Omatsu Y, Shimoyama S, Letterio JJ, Nakabayashi T, Tagaya H, Yamane T, Ogawa M, Nishikawa S, Ryoike K, Inaba K, Hayashi S and Kunisada T (2001): Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor-beta 1-dependent cells.
International Immunology 13: 695-704
- Henderson WR Jr. (1991): Eicosanoids and platelet-activating factor in allergic respiratory diseases.
American Reviews of Respiratory Disease 143: 86-90
- Henri S, Vremec D, Kamath A, Waithman J, Williams S, Benoist C, Burnham K, Handman E and Shortman K (2001): The dendritic cell populations of mouse lymph nodes.
Journal of Immunology 167: 741-748
- Holt PG, Schon-Hegrad MA, and McMenamin PG (1990): Dendritic cells in the respiratory tract.
Internal Review of Immunology 6: 139-149
- Holt PG, Haining S, Nelson DJ and Sedgwick JD (1994): Origin and steady state turnover of class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways.
Journal of Immunology 153: 256-261
- Huang WW, Garcia-Zepeda EA, Sauty A, Oettgen HC, Rothenberg ME and Luster AD (1998): Molecular and biological characterisation of the murine leukotriene B4 receptor expressed on eosinophils.
Journal of Experimental Medicine 188: 1063-1074
- Huang FP, Platt N, Wykes M, Major JR, Powell TJ, Jenkins CD and MacPherson GG (2000): A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes.
Journal of Experimental Medicine 191: 435-444
- Hui Y, Cheng Y, Smalera I, Jian W, Goldhahn L, Fitzgerald GA and Funk CD (2004): Directed vascular expression of human cysteinyl leukotriene 2 receptor modulates endothelial permeability and systemic blood pressure.
Circulation 110: 3360-3366

- Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S and Steinman RM (1992): Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Journal of Experimental Medicine* 176: 1693-1702
- Inaba K, Wittmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, Azuma M, Yagita H, K. Okumara K, Linsley PS and Ikehara S (1994): The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *Journal of Experimental Medicine* 180: 1849-1860
- Iversen L, Kragballe K and Ziboh VA (1997): Significance of leukotriene-A4 hydrolase in the pathogenesis of psoriasis. *Skin Pharmacology* 10: 169-177
- Iversen L and Kragballe K (2000): Arachidonic acid metabolism in skin health and disease Prostaglandins and Lipid Mediators 63: 25-42
- Irvin CG, Tu YP, JR Sheller and Funk CD (1997): 5-Lipoxygenase products are necessary for ovalbumin-induced airway responsiveness in mice. *American Journal of Physiology* 272: 1053-1058
- Iwasaki A and Kelsall BL (2001): Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double negative Peyer's patch dendritic cells. *Journal of Immunology* 166: 4884-4890
- Jakobsson PJ, Steinhilber D, Odlander B, Rådmark O, Claesson HE and Samuelsson B (1992): On the expression and regulation of 5-lipoxygenase in human lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89: 3521-3525
- Jenner E (1798): An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae.
- Jones TR, Labelle M, Belley M, Champion E, Charette L, Evans J, Ford-Hutchinson AW, Gauthier JY, Lord A and Masson P (1995): Pharmacology of montelukast sodium (Singulair), a potent and selective leukotriene D4 receptor antagonist. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 73: 191-201
- Kamohara M, Takasaki J, Matsumoto M, Saito T, Ohishi T, Ishii H and Furuichi K (2000): Molecular cloning and characterization of another leukotriene B₄ receptor. *Journal of Biological Chemistry* 275: 27000-27004
- Khalturin K, Becker M, Rinkevich B and Bosch TC (2003): Urochordates and the origin of natural killer cells: identification of a CD94/NKR-P1-related receptor in blood cells of *Botryllus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 622-627

- Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhe C, Perrin P, Romani N, Tripp CH, Douillard P, Leserman L, Kaiserlian D, Saeland S, Davoust J and Malissen B (2005): Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 22: 643-654
- Koch F, Stanzl U, Jennewein P, Janke K, Heufler C, Kampgen E, Romani N and Schuler G (1996): High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *Journal of Experimental Medicine* 184: 741-746
- Kühn H, Thiele BJ (1999): The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Letters* 449: 7-11
- Kurts C, Kosaka H, Carbone FR, Miller JF and Heath WR (1997): Class I-restricted cross presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8+ T cells. *Journal of Experimental Medicine* 186: 239-245
- Kuwabara K, Yasui K, Jyoyama H, Maruyama T, Fleisch JH and Hori Y (2000): Effects of the second-generation leukotriene B(4) receptor antagonist, LY293111Na, on leukocyte infiltration and collagen-induced arthritis in mice. *European Journal of Pharmacology* 402: 275-285
- Lal MA, Kennedy CRJ, Proulx PR and Hébert RL (1997): Bradykinin-stimulated cPLA2 phosphorylation is protein kinase C dependent in rabbit CCD cells. *American Journal of Physiology* 273: 907-915
- Lam S, Chan H, LeRiche JC, Chan-Yeung M and Salari H (1988): Release of leukotrienes in patients with bronchial asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 81: 711-717
- Langerhans P (1868): Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Archiv der Anatomie* 44: 325-337
- Lee CW, Lewis RA, Corey EJ and Austen KF (1983): Conversion of leukotriene D₄ to leukotriene E₄ by a dipeptidase released from the specific granule of human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* 48: 27-35
- Lewis RA, Mencia-Huerta JM, Soberman RJ, Hoover D, Marfat A, Corey EJ and Austen KF (1982): Radioimmunoassay for leukotriene B₄. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 79: 7904-7908
- Lewis RA and Robin JL (1985): Arachidonic acid derivatives as mediators of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 76: 259-264

- Lewis RA, Austen KF and Soberman RJ (1990): Leukotrienes and other products of the 5 lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. New England Journal of Medicine 323: 645-655
- Lötzer K, Spanbroek R, Hildner M, Urbach A, Heller R, Bretschneider E, Galczenski H, Evans JF and Habenicht AJR (2003): Differential leukotriene receptor expression And Calcium responses in endothelial cells and macrophages indicate 5 lipoxygenase-dependent circuits of inflammation and atherogenesis. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 23: 32-36
- Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie ALJ, Roessner S, Koch F, Romani N and Schuler G (1999): An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. Journal of Immunological Methods 223: 77-92
- Lutz MB, Kukutsch NA, Menges M, Roessner S and Schuler G (2000): Culture of bone marrow cells in GM-CSF plus high doses of lipopolysaccharide generates exclusively immature dendritic cells which induce alloantigen-specific CD4 T cell anergy *in vitro*. European Journal of Immunology 30: 1048-1052
- Lynch KR, O'Neill GP, Liu Q, Im DS, Sawyer N, Metters KM, Coulombe N, Abramovitz M, Figueroa DJ, Zeng Z, Connolly BM, Bai C, Austin CP, Chateaufneuf A, Stocco R, Greig GM, Kargman S, Hooks SB, Hosfield E, Williams DL Jr, Ford-Hutchinson AW, Caskey CT and Evans JF (1999): Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT₁ receptor. Nature 399: 789-793
- Maekawa A, Kanaoka Y, Lam BK and Austen KF (2001): Identification in mice of two isoforms of the cysteinyl leukotriene 1 receptor that result from alternative splicing. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 98: 2256-2261
- Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Henk A and Jonuleit H (2002): Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. Immunology and Cell Biology 80: 477-483
- Marks F and Furstenberger G (1983): Multistage tumor promotion in skin. Princess Takamatsu Symposium 14: 273-287
- Martin P, Martinez del Hoyo G, Anjuere F, Ruiz Ruiz S, Fernandez Arias C, Marin AR and Ardavin C (2000): Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8alpha(-) and CD8alpha(+) dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors. Blood 96: 2511-2519

- Martin P, Martinez del Hoyo G, Anjuere F, Fernandez Arias C, Hernandez Vargas H, Fernandez-L A, Parillas V and Ardavin C (2002): Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha⁺ B220⁺ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential.
Blood 100: 383-390
- Massard G, Tongio MM, Wihlm JM and Morand G (1996): The dendritic cell lineage: a ubiquitous antigen-presenting organization.
Annals of Thoracic Surgery 61: 252-258
- Mehrabian M, Allayee H, Wong J, Shih W, Wang XP, Shaposhnik Z, Funk CD and Lusis AJ (2002): Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice.
Circulation Research 91: 120-126
- Merad M, Fong L, Bogenberger J and Engleman EG (2000): Differentiation of myeloid dendritic cells into CD8alpha-positive dendritic cells in vivo.
Blood 96: 1865-1872
- Merad M, Manz MG, Karsunky H, Wagers A, Peters W, Charo I, Weissman IL, Cyster JG and Engleman EG (2002): Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions.
Nature Immunology 3: 1135-1141
- Metlay JP, Witmer-Pack MD, Agger R, Crowley MT, Lawless D and Steinman RM (1990): The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies.
Journal of Experimental Medicine 171: 1753-1771
- Miller DK, Gillard JW, Vickers PJ, Sadowski S, Leveille C, Mancini JA, Charleson P, Dixon RA, Ford-Hutchinson AW and Fortin R (1990): Identification and isolation of a membrane protein necessary for leukotriene production.
Nature 343: 278-281
- Morita H, Takeda K, Yagita H and Okumura K (1999): Immunosuppressive effect of leukotriene B(4) receptor antagonist in vitro.
Biochemical and Biophysical Research Communications 264: 321-326
- Moser M and Murphy KM (2000): Dendritic cell regulation of TH₁-TH₂ development.
Nature Immunology 1: 199-205
- Mosmann TR and Sad S (1996): The expanding universe of T-cell subsets: Th₁, Th₂ and more.
Immunology Today 17: 138-146

- Murphy RC, Hammarstrom S and Samuelsson B (1979): Leukotriene C: a slow-reacting substance from murine mastocytoma cells.
 Proceedings of the National Academy of Sciences USA 76: 4275-4279
- Nakano H, Yanagita M and Gunn MD (2001): CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells.
 Journal of Experimental Medicine 194: 1171-1178
- O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N and Steinman RM (1994): Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature.
 Immunology 82: 487-493
- Ogasawara H, Ishii S, Yokomizo T, Kakinuma T, Komine M, Tamaki K, Shimizu T and Izumi T (2002): Characterization of Mouse Cysteinyl Leukotriene Receptors mCysLT₁ and mCysLT₂.
 Journal of Biological Chemistry 277 (21): 18763–18768
- O'Garra A (1998): Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets.
 Immunity 8: 275-283
- Ogawa Y and Seyedin SM (1991): Purification of transforming growth factors beta 1 and beta 2 from bovine bone and cell culture assays.
 Methods in Enzymology 198: 317-27
- Okada T, Lian ZX, Naiki M, Ansari A, Ikehara S and Gershwin ME (2003): Murine thymic plasmacytoid dendritic cells.
 European Journal of Immunology 33: 1012-1019
- Ott VL, Cambier JC, Kappler J, Marrack P and Swanson BJ (2003): Mast cell-dependent migration of effector CD8⁺ T cells through production of leukotriene B₄.
 Nature Immunology 4: 974-981
- Pavli P, Hume DA, van den Pol E and Doe WF (1993): Dendritic cells, the major antigen presenting cells of the human colonic lamina propria.
 Immunology 78: 132-141
- Penrose JF, Gagnon L, Goppelt-Struebe M, Myers P, Lam BK, Jack RM, Austen KF and Soberman RJ (1992): Purification of human leukotriene C₄ synthase.
 Proceedings of the National Academy of Sciences USA 89: 11603-11606
- Peters-Golden M (1998) Cell biology of the 5-lipoxygenase pathway.
 American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 157: 227- 231

- Pulendran B, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E and Maliszewski CR (1999): Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 96: 1036-1041
- Pullerits T, Praks L, Skoogh BE, Ani R and Lötvall J (1999): Randomized Placebo controlled Study Comparing a Leukotriene Receptor Antagonist and a Nasal Glucocorticoid in Seasonal Allergic Rhinitis.
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 159: 1814–1818
- Rackal JM and Vender RB (2004): The treatment of atopic dermatitis and other dermatoses with leukotriene antagonists.
Skin Therapy Letter 9: 1-5
- Rådmark O, Shimizu T, Jornvall H and Samuelsson B (1984): Leukotriene A₄ hydrolase in human leukocytes. Purification and properties.
Journal of Biological Chemistry 259: 12339-12345
- Reiss TF, Chervinsky P, Dockhorn RJ, Shingo S, Seidenberg B and Edwards TB (1998): Montelukast, a once-daily leukotriene receptor antagonist, in the treatment of chronic asthma: a multicenter, randomized, double-blind trial. Montelukast Clinical Research Study Group.
Archives of Internal Medicine 158: 1213-1220
- Reusch MK and Wastek GJ (1989): Human keratinocytes in vitro have receptors for leukotriene B₄.
Acta Dermato-Venereologica 69: 429-31
- Robbiani DF, Finch RA, Jaeger D, Muller WA, Sartorelli AC and Randolph GJ (2000): The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes.
Cell 103: 757-768
- Romagnani S (1997): The Th₁/Th₂ paradigm.
Immunology Today 18: 263-266
- Romani N, Lenz A, Glassel H, Stoessel H, Stanzl H, Majdic O, Fritsch P and Schuler G (1989a): Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function.
Journal of Investigative Dermatology 93: 600-609
- Romani N, Koide S, Crowley M, Witmer-Pack M, Livingstone AM, Fathman CG, Inaba K and Steinman RM (1989b): Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cell.
Journal of Experimental Medicine 169: 1169-1178

- Rouzer CA and Samuelsson B (1985): On the nature of the 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes: enzyme purification and requirement for multiple stimulatory factors.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 82: 6040-6044
- Ruscetti FW, Akel S and Bartelmez SH (2005): Autocrine TGF-beta regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context.
Oncogene 24: 5751-5763
- Ruzicka T, Simmet T, Peskar BA and Ring J (1986): Skin levels of arachidonic acid Derived inflammatory mediators and histamine in atopic dermatitis and psoriasis.
Journal of Investigate Dermatology 86: 105-108
- Saeki H, Moore AM, Brown MJ and Hwang ST (1999): Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes.
Journal of Immunology 162: 2472-2475
- Sallusto F and Lanzavecchia A (2000): Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression.
Immunological Reviews 177: 134-140
- Samuelsson B, Dahlén SE, Lindgren JA, Rouzer CA and Serhan CN (1987): Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects.
Science 237: 1171-1176
- Samuelsson B and Funk CD (1989): Enzymes involved in the biosynthesis of leukotriene B₄.
Journal of Biological Chemistry 264: 19469-19472
- Sarau HM, Ames RS, Chambers J, Ellis C, Elshourbagy N, Foley JJ, Schmidt DB, Muccitelli RM, Jenkins O, Murdock PR, Herrity NC, Halsey W, Sathe G, Muir AI, Nuthulaganti P, Dytko GM, Buckley PT, Wilson S, Bergsma DJ and Hay DW (1999): Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor.
Molecular Pharmacology 56: 657-663
- Schreurs MW, Eggert AA, de Boer AJ, Figdor CG and Adema GJ (1999): Generation and functional characterization of mouse monocyte-derived dendritic cells.
European Journal of Immunology 29: 2835-2841
- Schuler G and Koch F (1991): Enrichment of epidermal Langerhans cells.
In: Epidermal Langerhans cells, Schuler G (ed.) CRC Press Inc., Boca Raton, FL.: 139-157

- Shibata D, Steczko J, Dixon JE, Hermodson M, Yazdanparast R and Axelrod B (1987):
Primary structure of soybean lipoxygenase-1.
Journal of Biological Chemistry 262: 10080-10085
- Shimizu T, Rådmark O and Samuelsson B (1984) Enzyme with dual lipoxygenase
activities catalyzes leukotriene A₄ synthesis from arachidonic acid.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 689-693
- Shortman K and Caux C (1997): Dendritic Cell Development: Multiple Pathways to
Nature's Adjuvants.
Stem Cells 15: 409-419
- Shortman K (2000): Burnet oration: dendritic cells: multiple subtypes, multiple origins,
multiple functions.
Immunology and Cell Biology 78: 161-165
- Shortman K and Liu YJ (2002): Mouse and human dendritic cell subtypes.
Nature Reviews Immunology 2: 151-161
- Spanbroek R, Stark HJ, Janßen-Timmen U, Kraft S, Hildner M, Andl T, Bosch FX,
Fusenig NE, Bieber T, Rådmark O, Samuelsson B and Habenicht AJR (1998):
5-Lipoxygenase expression in Langerhans cells of normal human epidermis.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 95: 663-668
- Spanbroek R, Hildner M, Steinhilber D, Fusenig N, Yoneda K, Rådmark O, Samuelsson B
and Habenicht AJR (2000): 5-lipoxygenase expression in dendritic cells generated
from CD34⁺ hematopoietic progenitors and in lymphoid organs.
Blood 96:3857-3865
- Spanbroek R, Hildner M, Köhler A, Müller A, Zintl F, Kühn H, Rådmark O, Samuelsson
B and Habenicht AJR (2001): IL-4 determines eicosanoid formation in dendritic
cells by down-regulation of 5-lipoxygenase and up-regulation of 15-lipoxygenase 1
expression.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 98: 5152-5157
- Spanbroek R, Gräbner R, Lötzer K, Hildner M, Urbach A, Rühling K, Moos MP, Kaiser B,
Cohnert TU, Wahlers T, Zieske A, Plenz G, Robenek H, Salbach P, Kühn H, Rådmark
O, Samuelsson B and Habenicht AJR (2003): Expanding expression of the 5-
lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 100: 1238-1243
- Spangrude GJ (1991): Hematopoietic stem-cell differentiation.
Current Opinion in Immunology 3: 171-178

- Springer TA (1994): Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm.
Cell 76: 301-314
- Steinhilber D (1994): 5-Lipoxygenase: enzyme expression and regulation of activity.
Pharmaceutica Acta Helvetiae 69: 3-14
- Steinman RM and Cohn ZA (1973): Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution.
Journal of Experimental Medicine 137: 1142-1162
- Steinman RM, Witmer MD, Nussenzweig MC, Chen LL, Schlesinger S and Cohn ZA (1980): Dendritic cells of the mouse: identification and characterization.
Journal of Investigative Dermatology 75: 14-16
- Steinman RM and Inaba K (1999): Myeloid dendritic cells.
Journal of Leukocyte Biology 66: 205-208
- Steinman RM, Turley S, Mellmann I and Inaba K (2000): The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells.
Journal of Experimental Medicine 191: 411-416
- Tager AM, Bromley SK, Medoff BD, Islam SA, Bercury SD, Friedrich EB, Carafone AD, Gerszten RE and Luster AD (2003): Leukotriene B₄ receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment.
Nature Immunology 4: 982-990
- Theorell H, Holman RT and Akeson A (1947): Crystalline lipoxidase.
Acta Chemica Scandinavica 1: 571-576
- Thurnher M, Zelle-Rieser C, Ramoner R, Bartsch G and Hörtl (2001): The disabled dendritic cell.
FASEB Journal 15: 1054-1061
- Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG and Weissman IL (2000): Development of CD8 α -positive dendritic cells from a common myeloid progenitor.
Science 290: 2152-2154
- Tryselius Y, Nilsson NE, Kotarsky K, Olde B and Owman C (2000): Cloning and characterization of cDNA encoding a novel human leukotriene B₄ receptor.
Biochemical and Biophysical Research Communications 274: 377-382
- Turnbull E and MacPherson G (2001): Immunobiology of dendritic cells in the rat.
Immunological Reviews 184: 58-68

- Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, Duvert Frances V, Vincent C, Schmitt D, Davoust J, Caux C, Lebecque S and Saeland S (2000): Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules.
Immunity 12: 71-81
- Valladeau J, Clair-Moninot V, Dezutter-Dambuyant C, Pin JJ, Kissenpfennig A, Mattei MG, Ait-Yahia S, Bates EEM, Malissen B, Koch F, Fossiez F, Romani N, Lebeque S and Saeland S (2002): Identification of mouse Langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues.
Journal of Immunology 168: 782-792
- Vandenabeele S, Hochrein H, Mavaddat N, Winkel K and Shortman K (2001): Human thymus contains two distinct dendritic cell populations.
Blood 97: 1733-1741
- Vremec D, Zorbas M, Scollay R, Saunders DJ, Ardavin CF, Wu L and Shortman K (1992): The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells.
Journal of Experimental Medicine 176: 47-58
- Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L and Shortman K (2000): CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen.
Journal of Immunology 164(6): 2978-2986
- Wang S, Gustafson E, Pang L, Qiao X, Behan J, Maguire M, Bayne M and Laz T (2000): A novel hepatointestinal leukotriene B₄ receptor. Cloning and functional characterization.
Journal of Biological Chemistry 275: 40686-40694
- Weiner HL (2001): Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta secreting Th3 regulatory cells.
Immunological Reviews 182: 207-214
- Werz O, Klemm J, Samuelsson B and Rådmark O (2001): Phorbol ester up-regulates Capacities for nuclear translocation and phosphorylation of 5-lipoxygenase in Mono Mac 6 cells and human polymorphonuclear leukocytes.
Blood 97: 2487-2495
- Weiss JW, Drazen JM, Coles N, McFadden ER, Weller PF, Corey EJ, Lewis RA and Austen KF (1982): Bronchoconstrictor effects of leukotriene C in human.
Science 216: 196-198

- Wijnholds J, Evers R, van Leusden MR, Mol CA, Zaman GJ, Mayer U, Beijnen JH, van der Valk M, Krimpenfort P and Borst P (1997): Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein.
Nature Medicine 3: 1275-1279
- Wollenberg A; Kraft S; Hanau D and Bieber T (1996): Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema.
Journal of Investigative Dermatology 106 (3): 446-453
- Woods JW, Evans JF, Ethier D, Scott S, Vickers PJ, Hearn L, Heibin JA, Charleson S and Singer II (1993): 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes.
Journal of Experimental Medicine 178: 1935-1946
- Yamaguchi Y, Tsumura H, Miwa M and Inaba K (1997): Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow.
Stem Cells 15: 144-153
- Yamamoto S (1991): „Enzymatic“ lipid peroxidation: reaction of mammalian lipoxygenases.
Free Radical Biology and Medicine 10: 149-159
- Yamamoto S (1992): Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions.
Biochimica et Biophysica Acta 1128: 117-131
- Yamaoka KA, Claesson HE and Rosen A (1989): Leukotriene B₄ enhances activation, proliferation, and differentiation of human B lymphocytes.
Journal of Immunology 143: 1996-2000
- Yamaoka KA, Dugas B, Paul-Eugene N, Mencia-Huerta JM, Braquet P and Kolb JP (1994): Leukotriene B₄ enhances IL-4-induced IgE production from normal human lymphocytes.
Cell Immunology 156: 124-134
- Yangihara S, Komura E, Nagafune J, Watarai H and Yamaguchi Y (1998): EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation.
Journal of Immunology 161: 3096-3102
- Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takuwa Y and Shimizu T (1997) : A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis.
Nature 387: 620-624

- Yokomizo T, Kato K, Terawaki K, Izumi T and Shimizu T (2000): A second leukotriene B₄ receptor, BLT₂. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders.
Journal of Experimental Medicine 192: 421-432
- Yokomizo T, Kato K, Hagiya H, Izumi T and Shimizu T (2001): Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low affinity leukotriene B₄ receptor, BLT₂.
Journal of Biological Chemistry 276: 12454-12459
- Zhang Y, ZhangYY, Ogata M, Chen P, Harada A, Hashimoto SI and Matsushima K (1999): Transforming growth factor-beta1 polarizes murine hematopoietic progenitor cells to generate Langerhans cell-like dendritic cells through a monocyte/macrophage differentiation pathway.
Blood 93: 1208-1220
- Zhao L, Moos MPW, Gräbner R, Pédrone F, Fan J, Kaiser B, John N, Schmidt S, Spanbroek R, Lötzer K, Huang L, Cui J, Rader DJ, Evans JF, Habenicht AJR and Funk CD (2004): The 5-lipoxygenase pathway promotes pathogenesis of hyperlipidemia-dependent aortic aneurysm.
Nature Medicine 10: 966-973

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Übersicht über die beiden Teile des Immunsystems	2
Abbildung 2:	Beziehungen zwischen der Entwicklung von DZ der lymphatischen und myeloischen Reihe	10
Abbildung 3:	Der 5-Lipoxygenase-Stoffwechselweg, seine Konstituenten und Rezeptoren	15
Abbildung 4:	Nachweis von 5-LO positiven Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen von En-face-Präparaten der Ohrepidermis von B6-Tieren und Kontrolle der Spezifität der Bindung des 5-LO Antiserums in der Ohrepidermis von B6Alox5 ^{-/-} Tieren	43
Abbildung 5:	Darstellung von epidermalen T-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen der Bauchhaut eines B6-Tieres	44
Abbildung 6:	Identifizierung von 5-LO exprimierenden dermalen Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen der Bauchhaut eines B6-Tieres	45
Abbildung 7:	Identifizierung von 5-LO exprimierenden Zellen der Trachea eines B6-Tieres durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen	47
Abbildung 8:	Nachweis von 5-LO positiven Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen in der Darmschleimhaut mit Peyerschen Plaques eines B6-Tieres	48
Abbildung 9:	Charakterisierung der Makrophagen durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen der Darmschleimhaut mit Peyerschen Plaques eines B6-Tieres	49
Abbildung 10:	Nachweis von DZ durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen der mesenterischen Lymphknoten eines B6-Tieres	50
Abbildung 11:	Identifizierung 5-LO positiver Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen mesenterischer Lymphknoten eines B6-Tieres	51

Abbildung 12:	Nachweis 5-LO exprimierender DZ durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen in subkutanen Lymphknoten eines B6-Tieres	51
Abbildung 13:	Charakterisierung der 5-LO positiven DZ durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen eines subkutanen Lymphknotens eines B6-Tieres	52
Abbildung 14:	Darstellung von 5-LO positiven Zellen der subkutanen Lymphknoten eines B6-Tieres durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen	53
Abbildung 15:	Darstellung der Verteilung 5-LO positiven Makrophagen durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen der subkutanen Lymphknoten eines B6-Tieres	53
Abbildung 16:	Charakterisierung der B-Zellen der subkutanen Lymphknoten eines B6-Tieres durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen	54
Abbildung 17:	Nachweis von 5-LO positiven Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen der Milz eines B6-Tieres	55
Abbildung 18:	Darstellung von Makrophagen und Granulozyten der Milz eines B6-Tieres durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen	56
Abbildung 19:	Identifizierung der 5-LO positiven Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen des Thymus eines B6-Tieres	58
Abbildung 20:	Charakterisierung der pDZ des Thymus eines B6-Tieres durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen	59
Abbildung 21:	PCR Analysen zur Überprüfung der 5-LO Defizienz	60
Abbildung 22:	Quantitative Darstellung von LZ in einem Quadrat-millimeter dorsaler Ohrepidermis	62
Abbildung 23:	Quantitative Darstellung von DZ der subkutanen Lymphknoten und der Milz	63
Abbildung 24:	Quantitative Darstellung der nach FITC-Behandlung in die subkutanen Lymphknoten eingewanderten DZ	64
Abbildung 25:	Charakterisierung der Knochenmark-generierten DZ einer B6-Maus mittels Durchflusszytometrie	66

Abbildung 26:	Durchflusszytometrische Analyse der Knochenmark-generierten DZ einer B6-Maus	67
Abbildung 27:	Charakterisierung der Knochenmark-generierten DZ einer B6Alox5 ^{-/-} -Maus mittels Durchflusszytometrie	68
Abbildung 28:	Quantitative Darstellung der Anzahl von Knochenmark-generierten DZ im Kulturüberstand von B6-Spendertieren	69
Abbildung 29:	Indirekte Immunfluoreszenzanalysen von Knochenmark-generierten DZ eines B6-Tieres	70
Abbildung 30:	Darstellung der Lokalisation der 5-LO in DZ durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen der unbehandelten Bauchhaut, der subkutanen Lymphknoten und der Ohrepidermis 18 Stunden nach FITC-Behandlung eines B6-Tieres	72
Abbildung 31:	Nachweis der Translokation der 5-LO in Knochenmark generierten DZ durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen	73
Abbildung 32:	Quantitative Darstellung der Transkripte einzelner Konstituenten des 5-LO Stoffwechselweges in Knochenmark-generierten DZ einer B6-Maus	74
Abbildung 33:	Quantitative Darstellung der Transkripte einzelner Konstituenten des 5-LO Stoffwechselweges der Epidermis einer B6-Maus	75
Abbildung 34:	LT-induzierte Kalziummobilisierung in Knochenmark-generierten DZ einer B6-Maus	76
Abbildung 35:	Indirekter Einfluss der 5-LO auf das Migrationsverhalten von LZ	85
Abbildung 36:	Initiale Schritte in der Entzündung der Haut	92

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verteilung der DZ-Subtypen der Maus in lymphatischen Geweben	7
Tabelle 2:	Übersicht über einige ausgewählte Lipoxygenasen von Säugetieren, Vorkommen und Krankheiten oder Vorgänge bei denen ein Einfluss dieser Enzyme oder deren Produkte diskutiert wird	13

8.3 Abkürzungsverzeichnis

A	Amper
Abb.	Abbildung
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
B6	C57BL/6J-Mausstamm
B6Alox5 ^{-/-}	C57BL/6Alox5 ^{-/-} -Mausstamm
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Kalziumionen
CCR	C-C Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
Cy	Cytochrom
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
FACS	fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FLAP	Fünf-Lipoxygenase aktivierendes Protein
GAPDH	Glyzerinaldehydphosphatdehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HEV	High Endothelial Venoules
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IgG	Gamma-Immunglobuline
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LO	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
LZ	Langerhans-Zelle
M	Molar

MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex
NKZ	Natürliche Killerzellen
n. s.	nicht signifikant
OD	optische Dichte
p.a.	zur Analyse
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PE	Phycoerythrin
pDZ	plasmazytoide Dendritischen Zellen
PLG	Phase Lock Gel
RIA	Radioimmunoassay
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkription Polymerase Kettenreaktion
s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
TNF	Tumor Nekrose Faktor
T _H -Zellen	T-Helfer-Zellen
u.a.	unter anderem
U	Einheiten
UV	Ultraviolett
V	Volt

8.4 Lebenslauf

Persönliches

Name: Sandra Döpping (geb. Schmidt)
Geburtsdatum: 22. August 1976
Geburtsort: Gera
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Schul Ausbildung

09/1983 bis 08/1991 Polytechnische Oberschule Gera
09/1991 bis 07/1995 Zabel-Gymnasium, Gera
Abschluss: Abitur

Studium

09/1995 bis 11/2000 Biologie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Diplomarbeit am Institut für Humangenetik und
Anthropologie der Friedrich-Schiller-Universität, Jena
Thema: Amplifikation von DNA aus
Skelettmaterial zur Rekonstruktion von genetischen
Unterschieden der Kulturen der Schnurkeramik und
Aunjetitz.
Abschluss: Diplom

01/2001 bis 09/2004 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Vaskuläre Medizin der Friedrich-Schiller-Universität,
Jena

8.5 Danksagung

Zum Gelingen meiner Dissertation haben viele Leute beigetragen, denen ich allen großen Dank schulde. Sei es durch die Anleitung, die Betreuung, die Einweisung in neue Arbeitstechniken, die Unterstützung im Labor, das stete Interesse am Fortgang meiner Arbeit oder das gute Arbeitsklima.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas J. R. Habenicht, Direktor des Instituts für Vaskuläre Medizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena, für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit in der genannten Einrichtung.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Wetzker, Leiter der Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, danke ich für die Bereitschaft, die Betreuung und Vertretung dieser Arbeit an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät zu übernehmen.

Mein vornehmlicher Dank gilt Dr. Rainer Spanbroek für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung. Seine zahlreichen Anregungen und die ständige Diskussionsbereitschaft bei der Leitung dieser Arbeit waren eine sehr wichtige Hilfe und eine wertvolle Erfahrung.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Katharina Lötzer, Dr. Marcus-Rene Lisy und Nicole John für die vielen Gedankenanstöße und Ideen.

Die Verständigung war immer ausgezeichnet und sehr produktiv.

Dem Laborleiter Markus Hildner und den technischen Assistentinnen Maria Franke, Christine Ströhl und Silke Noßmann möchte ich ganz besonders für die stets gewährte Hilfeleistung und das überaus angenehme Arbeitsklima danken.

Ferner gilt mein Dank Dr. Bernd Günther vom Institut für Versuchstierkunde, Jena und dem Team des Tierstalls für die professionelle Aufzucht und Betreuung der verwendeten Mausstämme.

Mein herzlicher Dank gilt nicht zuletzt meinem Mann Mario Döpping, für seine Liebe, Geduld und Unterstützung besonders in schwierigen Phasen während dieser Arbeit.

Zuletzt gilt nun mein Dank allen denen, die es verdient haben, ich aber leider vergessen habe hier zu nennen.

8.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Ich habe mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad doctor rerum naturalium beworben und weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des oben genannten akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt.

Erfurt, den 28. November 2005